

Untersuchungen zur Funktion und Verbreitung

Untersuchungen zur Funktion und Verbreitung
von selbstspießenden Introns der Gruppe I in Bacteria

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

Untersuchungen zur Funktion und Verbreitung

dem

Fachbereich Biologie

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Michaela Stommel

aus Merzig/Saar

Marburg/Lahn 1998

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden vom 1.1.1995 bis zum 31.1. 1998 am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Marburg/Lahn, unter Leitung von PD Dr. Barbara Reinhold-Hurek durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg/Lahn als Dissertation angenommen am:

Erstgutachter: PD Dr. Barbara Reinhold-Hurek

Zweitgutachter: Prof. Dr. Erhard Bremer

Tag der mündlichen Prüfung: 27. März 1998

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

I

1 ZUSAMMENFASSUNG

J

2 EINLEITUNG

K

3 MATERIAL UND METHODEN

I2

K.1 MaterialI2

K.1.1 ChemikalienI2

K.1.2 Mikroorganismen und PlasmideI2

K.2 Medien, Zellanzucht und WachstumsbedingungenI5

K.2.1 Anzucht von *Escherichia coli*I5

K.2.2 Anzucht von *Azoarcus* sp. BH72I5

K.2.3 Antibiotika und andere Zusätze I7

K.2.4 Zellanzucht und WachstumsbedingungenI8

Untersuchungen zur Funktion und Verbreitung

K.2.5 Stammhaltung und ReinheitskontrolleI9

K.3 Gaschromatographische Messung der Sauerstoffkonzentration und
AzetylenreduktionI9

K.4 Standardtechniken für das Arbeiten mit NukleinsäurenJ0

K.4.1 Allgemeine StandardmethodenJ0

K.4.2 Isolierung von NukleinsäurenJ0

K.4.3 KlonierungJ1

K.4.4 Klonierung von PCR-ProduktenJ3

K.5 Elektrophoretische Auftrennung von DNAJ4

K.5.1 Agarosegel-ElektrophoreseJ4

K.5.2 Polyacrylamid-GelelektrophoreseJ4

K.6 TransformationsverfahrenJ5

K.6.1 Transformation durch CaCl_2 und HitzeschockJ5

K.6.2 Elektrotransformation von *Azoarcus* sp. BH72J5

K.7 HybridisierungstechnikenJ6

K.7.1 KapillartransferverfahrenJ6

K.7.2 Hybridisierung mit Digoxigenin-markierten SondenJ6

K.8 Analyse von GesamtproteinenJ7

3.8.1 Extraktion von Gesamtproteinen zur zweidimensionalen
GelelektrophoreseJ7

Seite

3.8.2 Extraktion von Gesamtproteinen zur Westernblot-AnalyseJ7

3.8.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Westernblot-AnalyseJ8

3.8.4 Zweidimensionale GelelektrophoreseJ8

K.9 DNA-Amplifizierung mit der Polymerase-Ketten-ReaktionJ9

K.10 Bestimmung des 5'-Ende eines TranskriptesK1

K.11 *in vitro*-TranskriptionK1

Untersuchungen zur Funktion und Verbreitung

K.12 SequenzierungK1

3.12.1 Manuelle SequenzierungK1

3.12.2 Sequenzierung mit Hilfe eines automatischen SequenziergerätesK2

K.13 Nachweis der Lebensfähigkeit von *Azoarcus*-Zellen durch

in vivo-FluoreszenzfärbungK3

K.14 Präparation von Proben für elektronenmikroskopische AnalysenK3

K.15 Messung der Enzymaktivität der β -GlucuronidaseK3

4 ERGEBNISSE

K5

L.1 Aufbau des tRNA^{Ile}-Gens sowie des umgebenden GenbereichesK5

L.2 Unterbrechung des *ileX*-Gens im Genom von *Azoarcus* sp. BH72 durch

Komplementation mit einem plasmidkodierten tRNA^{Ile}-GenK8

L.3 Deletion des Introns im tRNA^{Ile}-Gen von *Azoarcus* sp. BH72L0

L.4 Analyse des 5'-Ende des tRNA^{Ile}-TranskriptsL3

L.5 Vergleichende Wachstumsstudien von *Azoarcus* sp. BH72 und der

Introndeletionsmutante *Azoarcus* sp. BHDRDIL5

4.5.1 Wachstumsvergleich unter aeroben Bedingungen in stickstoffhaltigem MediumL6

4.5.2 Wachstumsvergleich unter stickstofffixierenden BedingungenL8

4.5.3 Wachstumsvergleich unter mikroaeroben Bedingungen in L9 stickstoffhaltigem Medium

L.6 Vergleich von *Azoarcus* sp. BH72 und der Mutante *Azoarcus* sp. BHDRDI in

Dualkultur mit dem Ascomyceten *Acremonium alternatum* Stamm 2003M0

L.7 Überprüfung der Mutante *Azoarcus* sp. BHDRDI durch Komplementation

mit *ileX*M5

4.7.1 Aerobe Wachstumskurve mit der komplementierten MutanteM5

Untersuchungen zur Funktion und Verbreitung

4.7.2 Effekt der Kopienzahl von *ileX* auf das WachstumM7

L.8 Untersuchungen zum Phänotyp von *Azoarcus* sp. BHDRDI in der spät-stationären WachstumsphaseM9

4.8.1 Fluoreszenzmikroskopische Analyse von *Azoarcus* sp. BH72 und der Mutante *Azoarcus* sp. BHDRDIM9

4.8.2 Charakterisierung des Phänotyps der Mutante durch zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese N1

L.9 Untersuchungen zur Auswirkung der Introndeletion auf die Translation in *Azoarcus* sp. BHDRDI durch ReportergenstudienN2

L.10 Untersuchungen zur Verbreitung von Gruppe I Introns in BacteriaN4

4.10.1 Entwicklung eines PCR-Systems zur spezifischen Amplifikation von tRNA^{Ile}-GenenN4

4.10.2 Charakterisierung des neu gefundenen Gruppe I Introns in *Aquaspirillum delicatum* N7

4.10.3 *In vitro* Transkription zum Nachweis des SelbstspleißensN9

4.10.4 Entwicklung einer spezifischen Intronsonde zur Detektion von Introns in BacteriaO0

5 DISKUSSION

O2

M.1 Die tRNA^{Ile} in *Azoarcus* sp. BH72O2

- eine funktionelle NukleinsäureO2
- die Lokalisation im Genom von *Azoarcus* sp. BH72O4

M.2 Das Intron: ein Parasit gewinnt an Bedeutung ?O5

M.3 Ursprünglichkeit oder Neuerwerb: Die Verbreitung von Gruppe I Introns in O8 Bacteria

M.4 Ausblick 81

6 LITERATURVERZEICHNIS

82

7 ANHANG

1 ZUSAMMENFASSUNG

Azoarcus

spp. sind Gram-negative, aerobe, stickstofffixierende Bakterien, die taxonomisch der β -Gruppe der Proteobakterien zugeordnet werden. Mehrere Spezies der Gattung *Azoarcus*, u.a. *Azoarcus* sp. Stamm BH72, wurden aus der Endorhizosphäre von Kallargras (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth) isoliert. In *Azoarcus* sp. BH72 wurde ein 205 Nukleotide großes, *in vitro* selbstspleißendes Intron der Gruppe I gefunden. Es ist hinter dem dritten Anticodon-Nukleotid in einem tRNA-Gen inseriert. Die 76 Nukleotide große tRNA ist anhand von Sequenzvergleichen mit anderen tRNA-Genen eine tRNA^{Ile}, deren Anticodon wahrscheinlich durch Modifikation das Isoleucin Codon AUA bedient.

Ziel dieser Arbeit war die Aufklärung der Funktion der tRNA^{Ile} in *Azoarcus* sp. BH72 und des in diesem Gen inserierten Introns. Desweiteren sollten weitere Gruppe I Introns in Bacteria nachgewiesen und charakterisiert werden. Durch Komplementation mit einem plasmidkodierten *ileX* konnte das intakte *ileX*-Gen im Genom durch eine Kopie ausgetauscht werden, die durch eine Resistenzkassette unterbrochen war. Dies zeigte, daß das *ileX*-Gen in der Zelle präsent sein muß und somit diese tRNA^{Ile} essentiell für *Azoarcus* sp. BH72 ist. Um den Einfluß des Introns auf das Wachstum der *Azoarcus*-Zelle zu überprüfen, wurde das im tRNA^{Ile}-Gen inserierte Intron im Genom deletiert. Die intronlose Mutante zeigte unter aeroben und stickstofffixierenden Wachstumsbedingungen in vergleichenden Wachstumstudien mit dem Wildtyp einen signifikanten Wachstumsnachteil. Unter mikroaeroben Bedingungen mit Kaliumnitrat als Stickstoffquelle konnte dieser negative Effekt nicht nachgewiesen werden. Dies läßt vermuten, daß die Deletion des Introns einen Einfluß

auf die Verfügbarkeit funktioneller tRNA^{Ile} hat, der durch einen unterschiedlichen Bedarf an tRNA^{Ile} in der Zelle, in Abhängigkeit vom Stoffwechselweg auftritt. Offenbar ist die Präsenz des Introns notwendig, um die Ausbildung funktionsfähiger tRNA^{Ile} zu ermöglichen. Geht man von einer ursprünglichen Anwesenheit von Introns im Progenoten aus, und einen Verlust in einigen Evolutionslinien durch Rationalisierung des Genom so wurde das im *ileX*-Gen inserierte Intron vermutlich beibehalten, da es einen Einfluß auf die Reifung funktioneller tRNA^{Ile} und somit für das Wachstum der *Azoarcus*-Zelle erworben hat. Im Rahmen dieser Arbeit konnten zwei weitere Introns nachgewiesen werden, wobei das eine, in einem tRNA^{Ile}-Gen aus dem Proteobakterium *Aquaspirillum delicatum* inseriert, als selbstsplices Intron der Gruppe I charakterisiert werden konnte. Eine phylogenetische Einstufung der Intronsequenz zeigt die größten Homologien zu in ribosomalen Genen inserierten eukaryotischen Gruppe I Introns. Dies läßt vermuten, daß es sich um eine neuzeitliche Erwerbung über lateralen Gentransfer handelt.

2 EINLEITUNG

Als Introns werden Sequenzabschnitte bezeichnet, die nicht für die in diesen Genen enthaltene Information kodieren. Diese Bereiche sind in Eukarya und Archaea weit verbreitet. Sie werden zusammen mit dem sie umgebenden Gen, dem Exon, transkribiert und dann herausgeschnitten, damit die mRNA, tRNA oder rRNA funktionell aktiv werden kann. Diesen sehr exakt verlaufenden Excisions- und Ligationsprozeß bezeichnet man als Spleißen. Bisher wurden sechs verschiedene Intron-Familien nachgewiesen (Cech, 1990), die sich durch den Spleißmechanismus voneinander unterscheiden lassen (Lykke-Andersen *et al.*, 1997) (Abb. 1):

(I) Der Spleißmechanismus von Introns der Gruppe I läuft über eine Reihe von Transesterifizierungsreaktionen ab, wobei der Angriff an der Spleißstelle durch das 3'-OH eines freien Guanosintriphosphats stattfindet.

(II) Der Mechanismus von Introns der Gruppe II, III sowie spleißosomal gespleißten Introns ähnelt im katalytischen Ablauf dem von Gruppe I Introns. Es greift jedoch das 2'-OH-Ende eines in der RNA enthaltenden Nukleotids, eines spezifischen Adenylats, an der Spleißstelle an. Das Spleißprodukt tritt in Form einer sogenannten Lariatstruktur auf.

Sowohl bei Introns der Gruppe I als auch Gruppe II existieren *in vitro* selbstsplices Introns, die ohne zusätzliche Proteine den Spleißvorgang durchführen, sogenannte Ribozyme.

(III) Das Spleißen der in tRNAs enthaltenen Introns von Eukarya und Archaea verläuft enzymatisch. Die meist sehr kurzen Introns werden unter Zuhilfenahme einer Endonuklease sowie einer RNA-Ligase herausgespleißt.

Mit der Entdeckung von Gruppe I-Introns in tRNA-Genen von Cyanobakterien (Kuhse *et al.*, 1990, Xu *et al.*, 1990) zeigten sich die ersten Intron-Formen in Bacteria. Weitere Gruppe I-Introns wurden in tRNA-Genen des Proteobakteriums *Azoarcus* sp. BH72 sowie *Agrobacterium tumefaciens* (Reinhold und Shub, 1992) und einer Reihe weiterer Cyanobakterien (Biniszkiwicz *et al.*, 1994, Paquin *et al.*, 1997) nachgewiesen. Desweiteren konnten auch Introns der Gruppe II (Ferat und Michel, 1993; Knoop und Brennicke, 1994) in eubakteriellen Organismen detektiert werden. Bis jetzt sind in Bakterien allerdings Gruppe I-Introns nur in tRNA-Genen bekannt.

Außerdem wurden Introns in verschiedenen Phagen von *Escherichia coli* (Chu *et al.*, 1984; Gott *et al.*, 1986) sowie *Bacillus subtilis* (Goodrich-Blair *et al.*, 1990; Goodrich-Blair und Shub, 1994; Bechhofer *et al.*, 1994) gefunden.

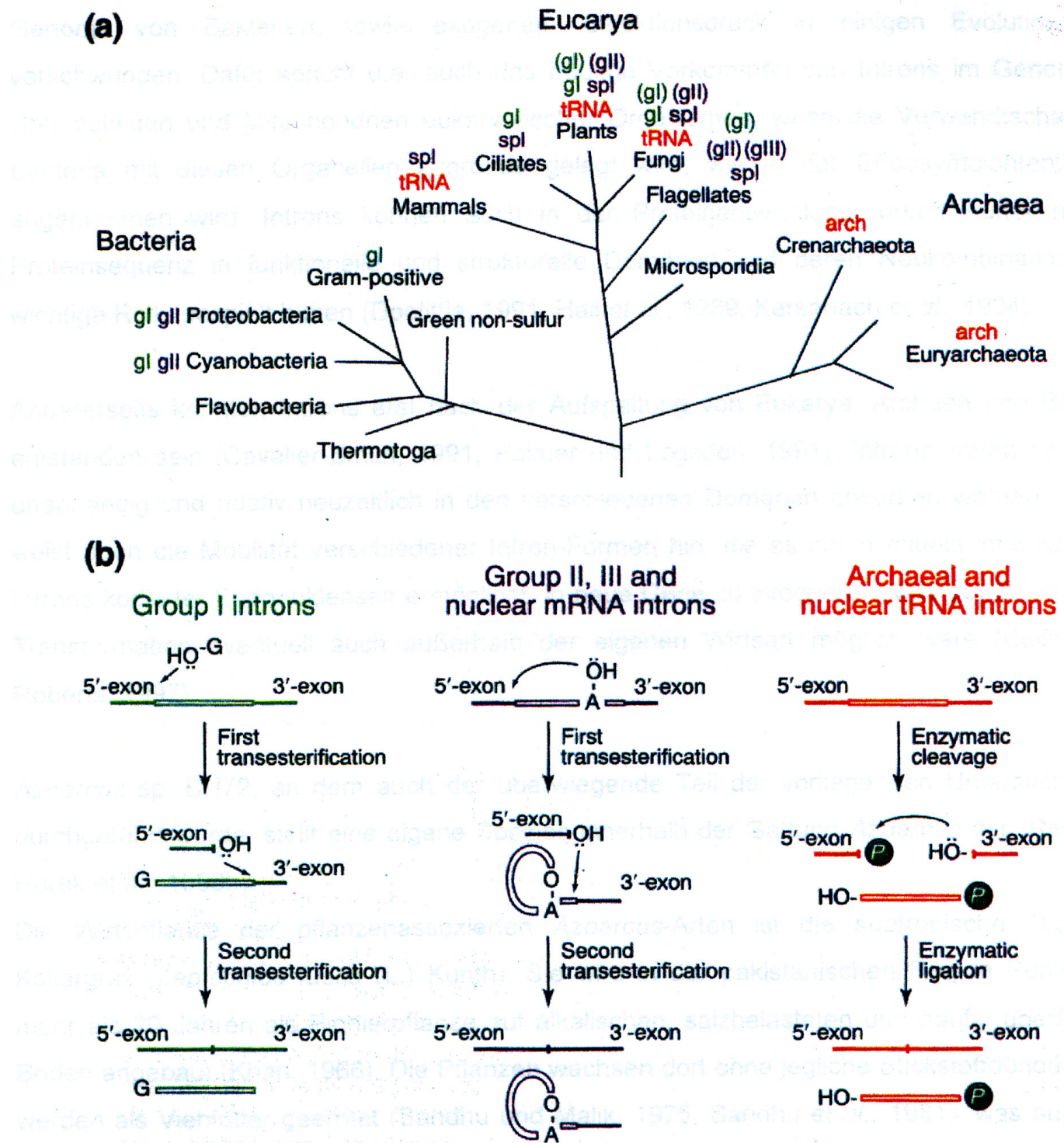


Abb. 1: Phylogenetische Darstellung der verschiedenen Intronklassen und Mechanismen des Intronspleißens (aus Lykke-Andersen *et al.*, 1997). (a) Phylogenetischer Stammbaum der bisher bekannten Verteilung der verschiedenen Intronklassen. Die Farbgebung erfolgte in Abhängigkeit zum Spleißmechanismus (siehe dazu auch (b)). Mitochondriale und Chloroplasten-Introns sind in Klammern angegeben. (b) Die drei Mechanismen des Intron-Spleißens. gl, Gruppe I-Introns; gII, Gruppe II-Introns; gIII, Gruppe III-Introns; spl, spleißosomale

Untersuchungen zur Funktion und Verbreitung

Introns; arch, achaeale Introns.

Introns waren bis dahin nur aus Eukarya und Archaea bekannt, und ihre Entdeckung in Bacteria warf Fragen bezüglich ihres Ursprungs in der Evolution und der phylogenetischen Verbreitung auf.

Einerseits konnten Introns ursprünglich im Genom des Progenoten der drei Reiche vorhanden gewesen sein. Sie wären dann im Verlauf der Evolution durch eine Rationalisierung des Genoms von Bakterien sowie exogenem Selektionsdruck in einigen Evolutionslinien verschwunden. Dafür spricht u.a. auch das häufige Vorkommen von Introns im Genom von Chloroplasten und Mitochondrien eukaryotischer Organismen, wenn die Verwandtschaft von Bacteria mit diesen Organellen zugrunde gelegt wird, wie in der Endosymbiontentheorie angenommen wird. Introns können auch in der Proteinentwicklung, durch Aufteilung der Proteinsequenz in funktionelle und strukturelle Domänen und deren Neukombination eine wichtige Rolle gespielt haben (Doolittle, 1991, Hall *et al.*, 1989, Kersanach *et al.*, 1994).

Andererseits könnten Introns erst nach der Aufspaltung von Eukarya, Archaea und Bacteria entstanden sein (Cavalier-Smith, 1991; Palmer und Logsdon, 1991). Introns wären demnach unabhängig und relativ neuzeitlich in den verschiedenen Domänen erworben worden. Darauf weist auch die Mobilität verschiedener Intron-Formen hin, die es ihnen mittels innerhalb des Introns kodierter Endonukleasen ermöglicht, in neue Gene zu integrieren, was durch natürliche Transformation eventuell auch außerhalb der eigenen Wirtsart möglich wäre (Belfort und Roberts, 1997).

Azoarcus

sp. BH72, an dem auch der überwiegende Teil der vorliegenden Untersuchungen durchgeführt wurde, stellt eine eigene Spezies innerhalb der Gattung *Azoarcus* dar (Reinhold-Hurek *et al.*, 1993b).

Die Wirtspflanze der pflanzenassoziierten *Azoarcus*-Arten ist die subtropische Graminee Kallargras (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth). Sie wird in der pakistanischen Region Punjab seit mehr als 20 Jahren als Pionierpflanze auf alkalischen, salzbelasteten und häufig überfluteten Böden angebaut (Khan, 1966). Die Pflanzen wachsen dort ohne jegliche Stickstoffdüngung und werden als Viehfutter geerntet (Sandhu und Malik, 1975; Sandhu *et al.*, 1981), was auf einen Beitrag biologischer Stickstofffixierung zum N-Haushalt der Pflanzen schließen läßt. Aus ihrer Endorhizosphäre wurden 1984 gelb pigmentierte, bewegliche Stäbchen isoliert (Reinhold *et al.*, 1986) und als neue Gattung *Azoarcus* beschrieben (Reinhold *et al.*, 1993a). *Azoarcus* spp., sind Gram-negative, aerobe, stickstofffixierende Bakterien, die taxonomisch der β -Untergruppe der Proteobakterien zugeordnet werden (Reinhold-Hurek *et al.*, 1993b; Hurek *et al.*, 1993).

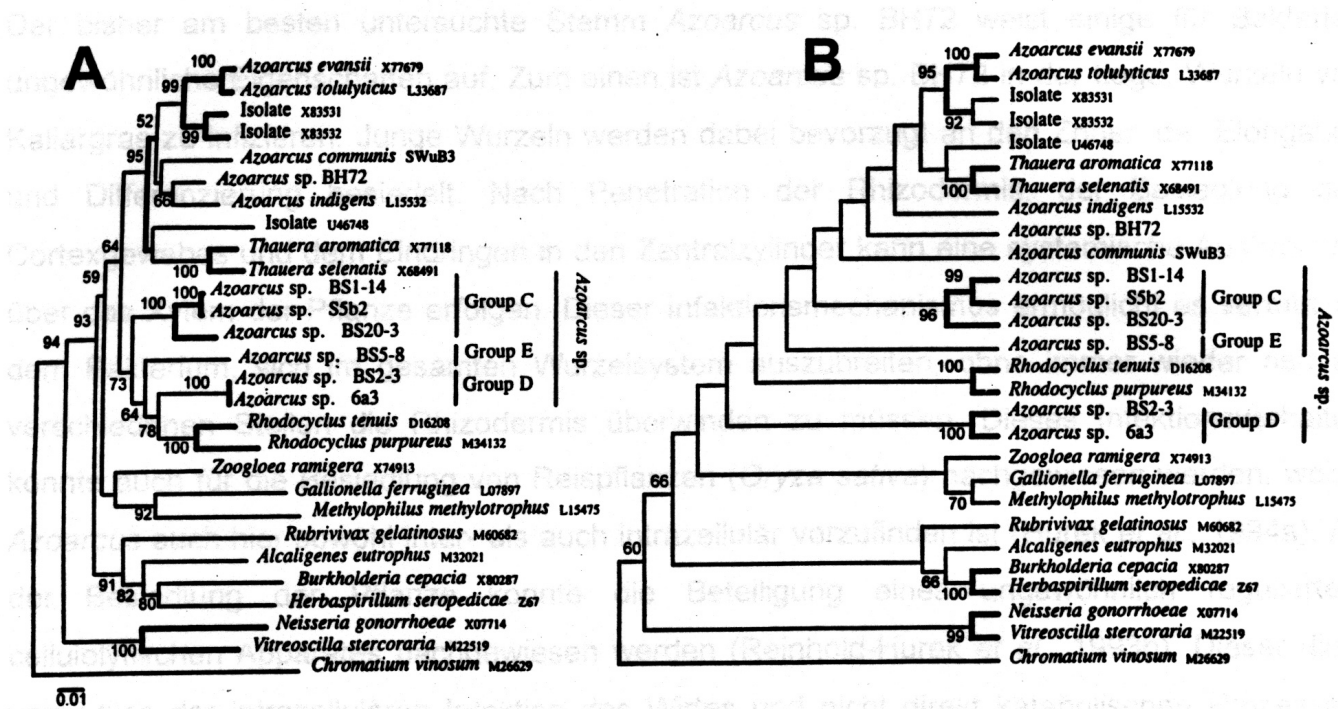


Abb. 2: Phylogenetische Analyse aller Entwicklungslinien der Gattung *Azoarcus* und anderer β -Proteobakterien auf der Basis von 16S rDNA-Sequenzen (aus Hurek *et al.* 1997). (A) Neighbor-joining-Programm. (B) Bootstrap Consensus Cladogramm, resultierend aus Parsimony Analyse ohne Berücksichtigung der Zweiglänge. Bootstrap-Vertrauensbereiche größer als 50% sind am Verzweigungsbereich angegeben. Accession-Nummern verwendeter Sequenzen stehen hinter dem Art/Stamm-Namen.

Die überwiegende Anzahl der *Azoarcus*-Stämme sowie das Isolat *Azoarcus* sp. BH72 wurde aus der Endorhizosphäre von Kallargras isoliert (Reinhold-Hurek *et al.*, 1993b). Weiterhin wurden einige neue Stämme assoziiert mit dem Sklerotium eines Basidiomyceten aus Reisfeldboden (Stammbezeichnung BS in Abb. 2) (Hurek *et al.*, 1997) nachgewiesen. Als nicht pflanzenassoziiert wurden das Isolat LMG 5514 aus ölhaltigem Raffinerieschlamm (Laguerre *et al.*, 1987), sowie die Arten *A. evansii* (Anders *et al.*, 1995) und *A. tolulyticus* (Zhou *et al.*, 1995) charakterisiert, welche aus Süßwassersedimenten, Humus bzw. aus mit Industrieabfällen belasteten Böden stammen (Fries *et al.*, 1994; Anders *et al.*, 1995).

Alle bisher bekannten, grasassoziierten Stämme der Gattung zeichnen sich durch einen obligat respiratorischen, chemoorganotrophen Stoffwechsel mit sehr begrenztem Substratspektrum aus. Als bevorzugte Kohlenstoffquelle werden Salze organischer Säuren, präferenziell Malat, sowie der Alkohol Ethanol verwertet (Reinhold-Hurek *et al.*, 1993b). Im Gegensatz dazu wachsen die beiden Arten *A. evansii* und *A. tolulyticus* auf Zuckern und verwerten außerdem monoaromatische Kohlenwasserstoffe.

Alle bisher isolierten Spezies der Gattung *Azoarcus* besitzen die Fähigkeit zur Stickstofffixierung.

Der bisher am besten untersuchte Stamm *Azoarcus* sp. BH72 weist einige für Bakterien ungewöhnliche Eigenschaften auf. Zum einen ist *Azoarcus* sp. BH72 in der Lage, Wurzeln von Kallargras zu infizieren. Junge Wurzeln werden dabei bevorzugt an den Zonen der Elongation und Differenzierung besiedelt. Nach Penetration der Rhizodermis, der Besiedlung des Cortexgewebes und dem Eindringen in den Zentralzylinder kann eine systemische Ausbreitung über das Xylem der Pflanze erfolgen. Dieser Infektionsmechanismus ermöglicht es vermutlich dem Bakterium, sich im gesamten Wurzelsystem auszubreiten, ohne immer wieder neu an verschiedenen Stellen die Rhizodermis überwinden zu müssen. Dieses Infektionsverhalten konnte auch für die Besiedlung von Reispflanzen (*Oryza sativa*) nachgewiesen werden, wobei *Azoarcus* auch hier sowohl inter- als auch intrazellulär vorzufinden ist (Hurek *et al.*, 1994a). An der Besiedlung der Pflanze konnte die

Untersuchungen zur Funktion und Verbreitung

Beteiligung eines ungewöhnlich regulierten, cellulolytischen Apparates nachgewiesen werden (Reinhold-Hurek *et al.*, 1993b). Dieser dient vermutlich der intrazellulären Infektion des Wirtes und nicht direkt katabolischen Prozessen. *Azoarcus* ist folglich zu einer endophytischen Lebensweise befähigt und in der Lage, sich systemisch in der Pflanze auszubreiten. Eine echte Endosymbiose konnte, im Gegensatz zu anderen, symbiontischen Endophyten wie z.B. Rhizobien, bisher allerdings nicht nachgewiesen werden.

Daneben weist *Azoarcus* sp. BH72 einige Besonderheiten bezüglich der Stickstofffixierung auf. *Azoarcus* ssp. haben einen strikt aeroben Stoffwechsel. In stickstofffreien Medien werden unter mikroaeroben Bedingungen, bei denen sich die Sauerstoffkonzentration im Bereich von 1-27 μM Gelöstsauerstoff bewegt, die Nitrogenasegene dereprimiert, und die Zellen fixieren Luftstickstoff (Hurek *et al.*, 1987).

Sinkt die Sauerstoffkonzentration in den Bereich von 30 nM, können die Bakterien in den sogenannten hyperinduzierten Zustand übergehen. Dieser Zustand ist durch physiologische Veränderungen sowie hohe spezifische Respirationsraten und eine gesteigerte Stickstofffixierungsrate mit erhöhter respiratorischer Effizienz gekennzeichnet (Hurek *et al.*, 1994a).

Die Hyperinduktion kann in Reinkultur erreicht werden, indem man empirisch optimierte N_2 -fixierende Batch-Kulturen gasdicht verschlossen mit reduzierter O_2 -Konzentration kultiviert. Durch die bakterielle Respiration sinkt die O_2 -Konzentration stark ab, und die Zellen können in den hyperinduzierten Zustand gelangen.

Bei Gelöstsauerstoffkonzentrationen im Bereich von 30nM O_2 zeigen die hyperinduzierten Zellen eine deutliche Erhöhung von V_{max} des respiratorischen Apparates sowie dessen Affinität für molekularen Sauerstoff. Außerdem wurde im Gegensatz zur normalen N_2 -Fixierung ein Anstieg der Fixierungsraten sowie eine engere Kopplung zwischen Atmung und Stickstofffixierung festgestellt (Hurek *et al.*, 1994a).

Besonders reproduzierbar und ausgeprägt kann die Membranbildung in Dualkultur mit dem Pilzisolat *Acremonium alternatum* 2003, einem Ascomyceten aus der Kallargrasrhizosphäre, induziert werden (Hurek *et al.*, 1995b). Die Hyperinduktion findet unter diesen Bedingungen über einen längeren Zeitraum statt, wobei *Azoarcus* sp. BH72 die von diesem Ascomyceten abgegebenen Substrate verstoffwechselt. Die meisten Bakterienzellen sind dabei an das Mycel des Pilzes angeheftet, wobei die hohe Atmungsrate des Pilzes vermutlich zu lokal extrem niedrigen O_2 -Konzentrationen führt, da die Stickstofffixierung und Diazosomenbildung schon bei einem O_2 -Gehalt von 4-8 % (v/v) im überstehenden Gasraum auftritt (Hurek *et al.*, 1995b).



Abb. 3: Transmissions-Elektronenmikroskopische Aufnahme einer hyperinduzierten *Azoarcus* sp. BH72-Zelle, in der Zellteilung arretiert.

Die Zellen wurden in Dualkultur mit dem Ascomyceten *Acremonium alternatum* Isolat 2003, rechts im Photo erkennbar, angezogen. Die internen Membranen erstrecken sich über die ganze Zelle, die an den Membranen lokalisierte Dinitrogenase-Reduktase wurde durch Immunogold-markierte Antikörper sichtbar gemacht. Die Größe des Balkens entspricht 0,5 μm (aus Hurek *et al.*, 1995b).

Parallel zeigen sich, bisher bei anderen Diazotrophen nicht beschriebene, morphologische Veränderungen der Zelle (Abb.3) (Hurek *et al.*, 1995b). Es bilden sich komplexe Membranen aus, die zu intrazytoplasmatischen Membranstapeln zusammengesetzt sind. Diese spezialisierten Strukturen, die mit der effektiven Stickstofffixierung einhergehen und als "Diazosomen" bezeichnet werden, konnten in nicht hyperinduzierten, normal stickstofffixierenden Zellen nicht nachgewiesen werden (Hurek *et al.*, 1995b).

Immunhistochemische Untersuchungen mit Antikörpern gegen das Eisenprotein der Nitrogenase zeigen, daß die Nitrogenase an diesen Membranstrukturen hoch angereichert ist. Die membrangebundene Nitrogenase, die ein höheres Molekulargewicht als das lösliche Enzym besitzt, stellt möglicherweise eine modifizierte Form dar (Hurek *et al.*, 1995b). Auch biochemisch läßt sich die Hyperinduktion charakterisieren: in der zweidimensionalen Gelelektrophorese lassen sich signifikante Unterschiede des Zellproteinmusters erkennen (Karg und Reinhold-Hurek, 1996), welche vermutlich auf differentieller Genexpression beruhen (Karg, 1996).

Außerdem gehört *Azoarcus* sp. BH72, wie oben dargestellt, zu den wenigen Bacteria, in denen ein Intron gefunden wurde. Das Intron liegt hinter dem dritten Anticodon-Nukleotid eines tRNA-Gens und spleißt sich mittels des Gruppe I-Mechanismus ohne zusätzliche Enzyme aus der Prä-tRNA heraus.

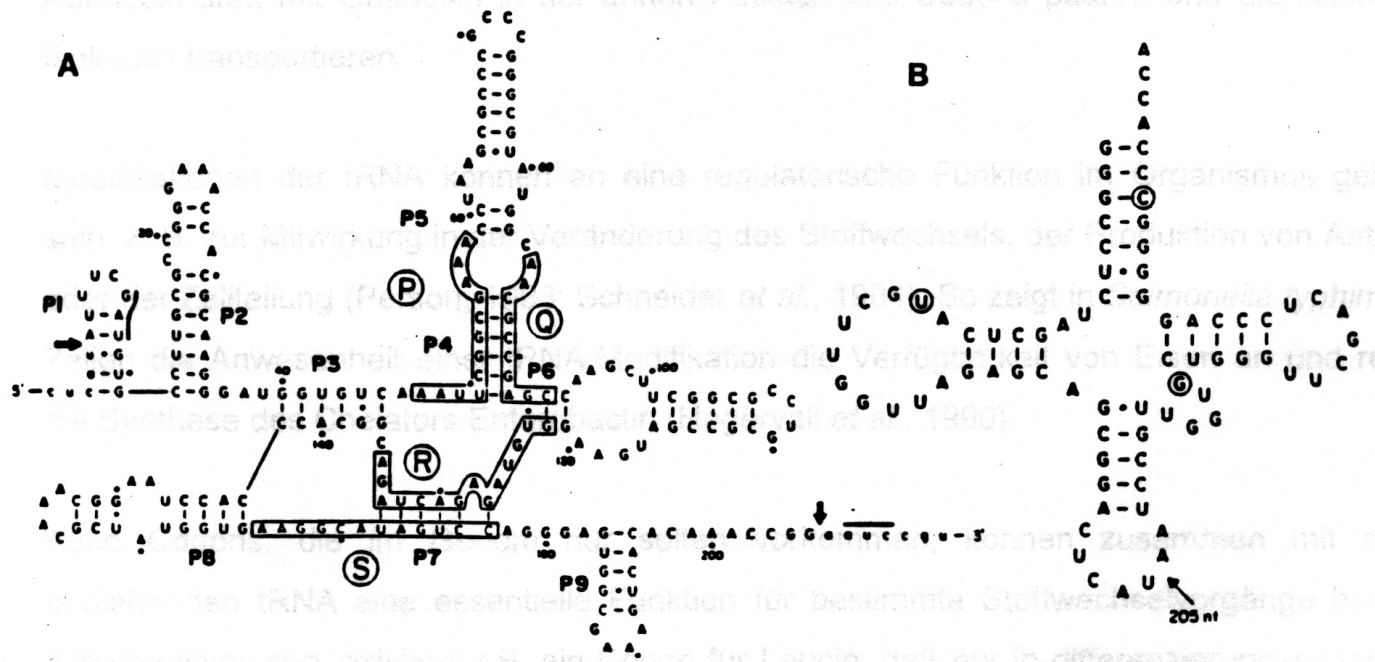


Abb. 4:

Sekundärstruktur des Introns (A) sowie der gespleißten (B) tRNA^{Ile}. In Abbildung A ist die ausgebildete Sekundärstruktur der Intronsequenz gezeigt, Pfeile markieren die Enden des Introns. Abbildung B stellt die tRNA^{Ile} dar, ein Pfeil markiert die Insertionsstelle der 205 Nukleotide großen Intronsequenz (aus Reinhold und Shub, 1992).

Mit einer Länge von 205 Nukleotiden ist es somit das bisher kleinste beschriebene, *in vitro* effektiv selbstspießende Gruppe I-Intron. Seine Funktion ist wie bei anderen bakteriellen Gruppe I-Introns völlig unbekannt. Die das Intron enthaltende tRNA (siehe Abb. 4) ist 76 Nukleotide groß und kodiert aufgrund ihres Anticodons CAU für die Aminosäure Methionin. Anhand von Sequenzvergleichen mit anderen tRNAs läßt sich aber darauf schließen, daß die tRNA das Isoleucin-Codon AUA bedient (Reinhold-Hurek und Shub, 1992).

tRNA-Moleküle enthalten einen hohen Anteil postranskriptionell modifizierter Basen. In humanen tRNAs sind bis zu 25% der Basen modifiziert, bakterielle tRNAs zeigen einen geringeren Anteil modifizierter Basen (Steinberg *et al.*, 1993). Bisher sind 80 verschiedene Basen-Modifikationen aus tRNA-Molekülen bekannt, davon 42 aus Bacteria (Crain *et al.*, 1997).

Eine Möglichkeit, mit dem ursprünglich vorhandenen CAU-Anticodon das Isoleucin-Codon zu bedienen, ist die Modifikation des Cytidins im Anticodon mit der Aminosäure Lysin zu der modifizierten Base Lysidin. Diese Art der Modifikation konnte aus *Escherichia coli* (Muramatsu *et al.*, 1988) und anderen Organismen wie *Mycoplasma capricolum* (Andachi *et al.*, 1989) sowie Mitochondrien von Kartoffelzellen (*Solanum tuberosum*) (Weber *et al.*, 1990) nachgewiesen werden. Bei Untersuchungen dieser tRNA^{Ile} in *Escherichia coli* stellte sich weiterhin heraus, daß die Identitätsmerkmale, im Gegensatz zu anderen tRNAs, hauptsächlich auf dem Anticodon basieren. Daher kann eine Änderung des Anticodons die Identität und die Aminoacylierung der tRNA durch die Aminoacyl-tRNA-Synthetase verändern (Nureki *et al.*, 1994; Senger *et al.*, 1997). Die modifizierte Base Lysidin in der ersten Position des Anticodons würde dann mit Adenosin statt mit Guanotin in der dritten Position des Codons paaren und die Aminosäure Isoleucin transportieren.

Modifikationen der tRNA können an eine regulatorische Funktion im Organismus gekoppelt sein, z. B. zur Mitwirkung in der Veränderung des Stoffwechsels, der Produktion von Antibiotika oder der Zellteilung (Person, 1993; Schneider *et al.*, 1994). So zeigt in *Salmonella typhimurium*-Zellen die Anwesenheit einer

Untersuchungen zur Funktion und Verbreitung

tRNA-Modifikation die Verfügbarkeit von Eisen an und reguliert die Synthese des Chelators Enterobactin (Hagervall *et al.*, 1990).

Auch Codons, die im Genom nur selten vorkommen, können zusammen mit der sie bedienenden tRNA eine essentielle Funktion für bestimmte Stoffwechselvorgänge haben. In *Streptomyces* spp. existiert z.B. ein Codon für Leucin, daß nur in differenzierungsspezifischen Genen vorkommt. Wird die das Leucin-Codon bedienende tRNA durch Mutation funktionsunfähig gemacht, so können *Streptomyces* spp. zwar vegetativ wachsen, sind aber nicht mehr zur Produktion von Antibiotika sowie zur Ausbildung eines Luftmycels fähig (Leskiv *et al.*, 1991). Das Isoleucin-Codon AUA, das von der modifizierten tRNA^{Ile} bedient werden soll, ist generell ein seltenes Codon für Isoleucin (Inokuchi und Yamao, 1995). In allen bisher sequenzierten Genen von *Azoarcus* sp. BH72 (ca. 24 kB) wurden zwar die beiden anderen für Isoleucin kodierenden Codons AUC und AUU, aber nicht das Isoleucin-Codon AUA gefunden. Dadurch stellt sich die Frage, ob es ein sehr seltenes, möglicherweise differenzierungs-spezifisches oder aber ein überhaupt nicht genutztes Codon darstellt.

Auch das inserierte Intron kann als regulatorische Komponente einen Einfluß auf den

Spleißvorgang sowie die allgemeine Reifung der tRNA haben. Die meisten Transkripte werden erst nach dem Spleißen des Introns funktionsfähig. Im Gegensatz dazu gibt es auch Beispiele stabiler mRNAs, die noch ein Intron enthalten (Gosh, *et al.*, 1981). Wird eine Prozessierung der RNA benötigt, wie im Fall von tRNAs, so besteht die Möglichkeit, daß das Intron präsent sein muß, damit die zur Prozessierung notwendigen oder sie erleichternde Enzyme das Substrat erkennen (Johnson und Abelson, 1983). So ist in *Saccharomyces cerevisiae* die Anwesenheit des Introns der tRNA^{Phe} zur Ausbildung der methylierten Base m⁵C₄₀ absolut notwendig. Andere die Anticodon-Schleife betreffende Basenmodifikationen wie Cm₃₂, Gm₃₄ und m¹G₃₇ finden erst statt, wenn sich das Intron herausgespleißt hat (Jiang *et al.*, 1997).

Eine Funktionsanalyse von Introns der Gruppe I kann erleichtert werden, wenn die Gene nicht in mehreren Kopien vorliegen und der Organismus genetischen Methoden leicht zugänglich ist. Daher ist *Azoarcus* sp. BH72 ein gut geeigneter Modellorganismus.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Aufklärung der Funktion des Introns für *Azoarcus* sp. BH72. Es sollte der Fragestellung nachgegangen werden, ob das Intron eine essentielle Bedeutung für die *Azoarcus*-Zelle bzw. eine essentielle Bedeutung für die Stickstofffixierung unter mikroaeroben Bedingungen sowie der Differenzierung, d.h. der sehr effizienten Stickstofffixierung unter hyperinduzierten Bedingungen von *Azoarcus* sp. BH72 hat. Dieser Fragestellung sollte durch gezielte Deletion des tRNA^{Ile}-Introns im Genom nachgegangen werden. In weiteren Untersuchungen wie vergleichenden Wachstumskurven sollte der Phänotyp der introndeletierten genomischen Mutante charakterisiert werden. Parallel sollte die Verbreitung von Introns in Bacteria untersucht werden. Wie vorstehend erwähnt, sind bisher nur wenige Introns in Bacteria gefunden worden, und daher ist über die Herkunft und die Verbreitung von Introns in diesem Reich wenig bekannt. Zum Nachweis sollte ein Testsystem entwickelt und optimiert werden, mit dem es möglich ist, Introns in verschiedenen Bakterien zu detektieren. Neu gefundene Introns sollten charakterisiert werden. Eine phylogenetischer Vergleich sollte Aufschluß über einen Zusammenhang zwischen Verbreitung und Verwandtschaft der Introns geben.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden Chemikalien und Biochemikalien von den Firmen Fluka (Buchs, Schweiz), Merck (Darmstadt), Sigma (Deisenhofen), Difco (Detroit, Michigan, USA), Boehringer (Mannheim), New England Biolabs (Schwalbach), Amersham Lifescience (Braunschweig) und Biozym

Untersuchungen zur Funktion und Verbreitung

(Hess. Oldendorf) bezogen.

3.1.2 Organismen und Plasmide

Organismen

Die in dieser Arbeit verwendeten Mikroorganismen können Tabelle 1 entnommen werden.

Tab. 1: Verwendete Mikroorganismen und ihre Eigenschaften.

Stamm	Relevanter Genotyp	Herkunft / Referenz
-------	--------------------	---------------------

Escherichia coli

DH5 α F-, ϕ 80d/*lacZ* Δ M15, Hanahan, 1983

$\Delta(lacZYA-argF)_{U169}$,

recA1, endA1,

hsdR17(r_K⁻, m_K⁺), *supE44*

λ -, *thi-1*, *relA1*

Azoarcus

sp.

BH72 Wildtyp Reinhold *et al.*, 1986

BHIO15 Ap^R, Sm^R, Sp^R, *intX*:: Reinhold-Hurek, pBGB24 Ω unpublizierte Daten

BHIDR7 Tc^R, Sm^R, Sp^R, $\Delta(intX$:: vorliegende Arbeit

. Sp^R)

BHSRD4 Ap^R, *ileX*::pBGB24d vorliegende Arbeit

BHDRDI $\Delta(intX)$ vorliegende Arbeit

BH72K Ap^R; *ileX*::pBGB10 vorliegende Arbeit

BHDRDIK Ap^R, BHDRDI, *ileX*::pBGB10 vorliegende Arbeit

Pilz

Acremonium alternatum

Wildtyp Hurek *et al.*, 1995b

Stamm 2003

Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide können Tabelle 2 entnommen werden.

Tab. 2: Verwendete Plasmide und ihre Eigenschaften

Stamm	Relevanter Phänotyp	Herkunft / Referenz
-------	---------------------	---------------------

bzw. Genotyp

pUC19	Ap ^R , ColE1-Replikon	New England Biolabs, Schwalbach	nach Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
-------	----------------------------------	---------------------------------	--

(siehe Abb. 5)

pUC4K	Ap ^R , Km ^R , ColE1-Replikon	Pharmacia Biotech, Freiburg
-------	--	-----------------------------

pUC19::1,2 kb Kanamycin-

Resistenzkassette (*EcoRI*)

pBBRMCS III	Tc ^R , Vektor mit breitem Wirts-	Kovach <i>et al.</i> , 1995
-------------	---	-----------------------------

spektrum (siehe Abb. 5)

pBlueskript-II KS+	Ap ^R , ColE1-Replikon	Stratagene, Heidelberg
--------------------	----------------------------------	------------------------

(siehe Abb. 5)

pBGB10	Ap ^R , <i>ileX</i> , 1700 bp <i>Pst</i> I-	Reinhold-Hurek,
--------	---	-----------------

Fragment in pUC19 unpublizierte Daten

pBGB10d	Ap ^R , pBGB10 mit 205 bp	Stommel, 1994
---------	-------------------------------------	---------------

Introndeletion

pBGB24	Ap ^R , <i>ileX</i> , 4,1 kb <i>Sau3A</i> I/	Reinhold-Hurek,
--------	--	-----------------

Stu I-Fragment in *Bam*H I/*Sst* I- unpublizierte Daten

geschnittenem pUC19

pBGB24d	Ap ^R , pBGB24 mit 205 bp	Stommel, 1994
---------	-------------------------------------	---------------

Introndeletion

Untersuchungen zur Funktion und Verbreitung

pBGB24 Ω Ap^R, Sm^R, Sp^R, pBGB24:: Ω Reinhold-Hurek,

(intron:: Ω) unpublizierte Daten

pUIDAKS Ap^R, 2,2 kb *EcoR* I-*uidA*-Fragment Egner *et al.*, Manuskript in

in pBlueskript-II KS+ Vorbereitung

pMSMCS10 Tc^R; 1,7kb-Pst I-Fragment aus vorliegende Arbeit

pBGB10 in pBBRMCS III (siehe Abb. 9)

pUC4KUIDA Ap^R, *Hind* III/*Sma* I-2,2 kb *uidA*- vorliegende Arbeit

Fragment aus pUIDAKS in pUC4K

pMSKUIDA13 Ap^R, Tc^R, 2,5 kb *Pst* I-Fragment vorliegende Arbeit

aus pUC4KUIDA in pBBRMCS III

pMSAD1 Ap^R, 219 bp *Hinc* II-Fragment aus vorliegende Arbeit

Acidovorax delafieldii in pUC19 (siehe Tab. 3)

pMSAD3 Ap^R, 60 bp *Hinc* II-Fragment aus vorliegende Arbeit

Acidovorax delafieldii in pUC19 (siehe Tab. 3)

pMSAD4 Ap^R, 304 bp *Hinc* II-Fragment aus vorliegende Arbeit

Acidovorax delafieldii in pUC19 (siehe Tab. 3)

pMSAD10 Ap^R, 45 bp *Hinc* II-Fragment aus vorliegende Arbeit

Acidovorax delafieldii in pUC19 (siehe Tab. 3)

pMSAE11 Ap^R, 282 bp *Hinc* II-Fragment aus vorliegende Arbeit

Azoarcus evansii in pUC19 (siehe Tab. 3)

pMSAE20 Ap^R, 338 bp *Hinc* II-Fragment aus vorliegende Arbeit

Azoarcus evansii in pUC19 (siehe Tab. 3)

pMSAQ42 Ap^R, 327 bp *Hinc* II-Fragment aus vorliegende Arbeit

Aquaspirillum delicatum in pUC19 (siehe Tab. 3)

pMSAQ48 Ap^R, 327 bp *Hinc* II-Fragment aus vorliegende Arbeit

Untersuchungen zur Funktion und Verbreitung

Aquaspirillum delicatum in pUC19 (siehe Tab. 3)

pMSCX123 Ap^R, 486 bp *Hinc* II-Fragment aus vorliegende Arbeit

Chlorobium iimicola tassajara (siehe Tab. 3)

in pUC19

pBLUEAQ48 Ap^R, 327 bp *Bam*H I/*Hind* III vorliegende Arbeit

-Fragment aus pMSAQ48 in

pBlueskript-II KS+

3.2 Medien, Zellanzucht und Wachstumsbedingungen

Die folgenden Nährmedien wurden zur Anzucht der verschiedenen Bakterienstämme verwendet. Die Medien und Lösungen wurden, soweit möglich, autoklaviert. Nicht zu autoklavierende Lösungen wurden sterilfiltriert.

Untersuchungen zur Funktion und Verbreitung

Den flüssigen Nährmedien wurde zum Herstellen von Nährböden 1,5 % Agar zugegeben.

3.2.1 Anzucht von *Escherichia coli*

Allgemein wurden *Escherichia coli*-Zellen in folgendem Medium angezogen:

LB-Medium (Luria-Bertani-Medium)

(Sambrook *et al.*, 1989)

10 g/l Bacto-Trypton

5 g/l Hefeextrakt

10 g/l NaCl zugeben.

pH 7,0

LB+-Medium

(Kushner, 1978)

10 g/l Bacto-Trypton

10 g/l Hefeextrakt

5 g/l NaCl

10 mM MgSO₄

10 mM MgCl₂

2,5 mM KCl

pH 7,0

Stammhaltung-Stichagar

(Ausubel *et al.*, 1987)

100 g/l Nutrient Broth

5 g/l NaCl

10 mg/l Cystein-Hydrochlorid

10 mg/l Thymin

6 g/l Agar

Untersuchungen zur Funktion und Verbreitung

3.2.2 Anzucht von *Azoarcus* sp. BH72

Azoarcus

sp. BH72 wurde mit den nachfolgenden Medien angezogen. Dabei wurden VM-Medium sowie VM-Medium mit Ethanol zur Zellanzucht unter normalen Wachstumsbedingungen verwandt.

VM-Medium

(Reinhold-Hurek *et al.*, 1993b)

2 g/l MgSO₄ [7 H₂O]

1 g/l NaCl

0,264 g/l CaCl₂ [2 H₂O]

0,1 g/l MnSO₄[H₂O]

0,02 g/l Na₂MoO₄ [2 H₂O]

0,066 g/l Fe (III)-EDTA

1 g/l Hefeextrakt

0,5 g/l NH₄Cl

1 g/l NaCl

0,4 g/l KH₂PO₄

0,6 g/l K₂HPO₄

3 g/l Bakto-Trypton

5 g/l Äpfelsäure

4,5 g/l KOH

pH 6,8

VM-Medium mit Ethanol

(Hurek und Reinhold-Hurek, 1995a). Entspricht in seiner Zusammensetzung dem VM-Medium; es wurden jedoch Äpfelsäure und Kaliumhydroxid durch 6 ml pro Liter 100%igen sterilfiltrierten Ethanol ersetzt.

SM-Medium sowie SM-Medium mit Stickstoff wurden zur Anzucht von *Azoarcus* sp. BH72 unter N₂-fixierenden Bedingungen verwandt:

SM-Medium

(Reinhold *et al.*, 1986)

Untersuchungen zur Funktion und Verbreitung

2 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

1 g/l NaCl

0,264 g/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

0,1 g/l $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

0,02 g/l $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

0,066 g/l Fe (III)-EDTA

0,4 g/l KH_2PO_4

0,6 g/l K_2HPO_4

5 g/l Äpfelsäure

4,5 g/l KOH

pH 6.8

SM-Medium mit Stickstoff

(Reinhold *et al.*, 1985)

Entspricht in seiner Zusammensetzung dem SM-Medium, es werden jedoch zusätzlich 0,1 g/l

Hefeextrakt sowie 0,5 g/l Ammoniumchlorid zugesetzt.

SM-Medium mit Stickstoff für die Fermenteranzucht

(modifiziert nach Reinhold *et al.*, 1985)

Entspricht in seiner Zusammensetzung dem SM-Medium; es wurden jedoch statt Ammoniumchlorid 0,5 g/l Kaliumnitrat als N-Quelle zugesetzt.

Medium für den Ascomyceten 2003 (Dualkultur

)

Medium Fungi (Hurek *et al.*, 1995b)

0,2 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

1,6 g/l NaCl

20,0 mg/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

10,0 mg/l $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

2,0 mg/l $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

66,0 mg/l Fe(III)-EDTA

Untersuchungen zur Funktion und Verbreitung

50,0 mg/l D/L-Malat

5,0 g/l Glucose (sterilfiltriert)

0,4 g/l K_2HPO_4 (sterilfiltriert)

0,6 g/l KH_2PO_4 (sterilfiltriert)

4,3 g/l Betainphosphat (sterilfiltriert)

0,58 g/l L-Prolin (sterilfiltriert)

0,42 g/l Cholinchlorid (sterilfiltriert)

1,0 ml/l Vitamin-Stammlösung (sterilfiltriert):

10,0 g/l Myo-Inositol

100,0 mg/l Nikotinamid

100,0 mg/l Pyridoxin-HCl

100,0 mg/l Thiamin-HCl

50,0 mg/l D-Calcium-Pantothenat

2,0 g/l Folsäure

1,0 ml/l p-Aminobenzoat (aus Stammlösung mit 1 mg/ml H_2O)

1,0 ml/l Biotin (aus Stammlösung mit 0,5 mg/ml H_2O)

0,05 g/l Cholinchlorid

0,01 g/l Riboflavin

0,1 g/l Ascorbinsäure

1,0 ml/l Vitamin A (aus Stammlösung mit 0,5 mg/ml Ethanol)

1,0 ml/l Vitamin D_3 (aus Stammlösung mit 0,5 mg/ml Ethanol)

1,0 ml/l Vitamin B_{12} (aus Stammlösung mit 1 mg/ml Ethanol)

3.2.3 Antibiotika und andere Zusätze

Antibiotika wurden dem auf ca. 50°C abgekühlten Medium zugegeben. Die Konzentration der Antibiotika in der Stammlösung sowie die Arbeitslösung für *Escherichia coli* und *Azoarcus* sp. BH72 kann Tabelle 3 entnommen werden.

Tab. 3: Stammlösungen sowie Arbeitskonzentrationen der in dieser Arbeit eingesetzten Antibiotika

Untersuchungen zur Funktion und Verbreitung

Antibiotikum Stamm- gelöst in Arbeitskonzentration für

Konzentration *E. coli* / *Azoarcus* sp. BH72

Ampicillin 10 mg/ml aqua demin. 150 µg/ml / 30 µg/ml

Chloramphenicol 15 mg/ml Ethanol 25 µg/ml / 25 µg/ml

Kanamycin 10 mg/ml aqua demin. 30 µg/ml / 30 µg/ml

Spektinomycin 15 mg/ml aqua demin. 50 µg/ml / 25 µg/ml

Streptomycin 10 mg/ml aqua demin. 20 µg/ml / 20 µg/ml

Tetracyclin 12,5 mg/ml Ethanol 12,5 µg/ml / 2,5 µg/ml

3.2.4 Zellanzucht und Wachstumsbedingungen

3.2.4.1 Zellanzucht und Wachstumsbedingungen von *Escherichia coli*

E. coli

hat sein Wachstumsoptimum bei 37°C. Zur Produktion von Zellmasse wurden die Kulturen in LB-Flüssigmedium (3.2.1), sofern nicht anders angegeben, aerob 12-14 h auf dem Roller inkubiert bzw. in Erlenmeyerkolben schüttelnd (200 Upm, 25 mm Hub) angezogen. Kulturplatten wurden aus Flüssigmedien oder von schon bewachsenen Platten beimpft und bei 37°C 12-14 h inkubiert.

3.2.4.2 Zellanzucht und Wachstumsbedingungen von *Azoarcus* sp. BH72

Aerobes Wachstum

Azoarcus

sp. BH72 -Kulturen wurden ebenfalls bei 37°C angezogen. Wachstumskulturen wurden, sofern nicht anders angegeben, in VM-Ethanol-Flüssigmedium aerob 12-14 h in 10-100 ml Ansätzen in 100-500 ml Erlenmeyerkolben schüttelnd (200 Upm, 25 mm Hub) angezogen. Kulturplatten wurden aus Flüssigmedien oder von schon bewachsenen Platten beimpft und bei 37°C 24-48 h inkubiert.

Stickstofffixierendes Wachstum

Zur Anzucht unter N₂-fixierenden Bedingungen wurde *Azoarcus* sp. BH72 in SM-Medium (3.2.2) in einem gasdicht verschlossenen Erlenmeyer-Kolben angezogen, der Gasraum mit Stickstoff gespült und eine Sauerstoffkonzentration von 1,8% eingestellt. Die Kultur wurde bis zu einer OD₅₇₈ von 0,3 angezogen und dann geerntet.

Wachstum im Laborfermenter

Azoarcus

sp. BH72 wurde für die Wachstumskulturen unter N₂-fixierenden und mikroaeroben Bedingungen im Laborfermenter Biostat B (Braun Biotech, Melsungen) angezogen. Das Kulturvolumen betrug dabei 1,8 l. Als Kulturmedium wurde SM verwendet, dem je nach Wachstumsbedingung Kaliumnitrat als Stickstoffquelle zugefügt wurde (3.2.2). Die Sauerstoffkonzentration war während der Wachstumskurve auf 0,2 % reguliert und die Temperatur durch Doppelmanteltemperierung auf 37°C konstant gehalten. Die Durchmischung erfolgte bei einer Umdrehungsgeschwindigkeit der Rührerwelle von 600 U/min.

3.2.4.3 Anzucht und Wachstumsbedingungen des Ascomyceten 2003

Der zum Wachstum von *Azoarcus* sp. BH72 in Dualkultur eingesetzte Ascomycet *Acremonium alternatum* Stamm 2003 wurde auf VM-Ethanol-Agarplatten (3.2.2) kultiviert.

3.2.3.4 Anzucht und Wachstumsbedingungen von *Azoarcus* sp. BH72 und dem Ascomyceten *Acremonium alternatum* Stamm 2003 in Dualkultur

Für das Wachstum von *Azoarcus* sp. BH72 mit dem Pilzisolat 2003 wurden frisch aus der Stammhaltung in flüssigem Stickstoff revitalisierte Bakterien und Pilze separat auf VM-Ethanol-Platten vorkultiviert und gemeinsam in mit Gummistopfen gasdicht verschlossenen 1 l-Serumflaschen, mit jeweils 200 ml "Medium Fungi" (siehe 3.2.2) bei 30 °C und 100 Upm auf einem Orbitalschüttler (Certomat MO) gezogen (Hurek *et al.*, 1995b). Durch gaschromatographische Messung wurde die Abnahme der Sauerstoffkonzentration sowie die Zunahme der Ethylenkonzentration im Gasraum der Kulturen kontrolliert (3.3). Der initiale pO_2 lag bei atmosphärischer Konzentration. Die Bakterien wurden nach einer Abnahme der Sauerstoffkonzentrationen auf 3,0% - 5,0% O_2 in der Gasphase geerntet. Zur Ernte für die Proteinextraktion wurde das, an dem die *Azoarcus*-Zellen adsorbiert vorliegende Pilzmycel mechanisch mit einem Küchenmixer homogenisiert, die Masse abzentrifugiert und das erhaltene Zellsediment zweimal mit 1xTBS-Puffer (10 mM Tris-HCl-Puffer pH 7.5, 150 mM NaCl) gewaschen.

3.2.5 Stammhaltung und Reinheitskontrolle

Escherichia coli

-Kulturen wurden durch Kolonienform und -farbe, Wachstumszeit, mikroskopische Kontrolle und Selektion auf Resistenzen durch enthaltende Plasmide auf ihre Reinheit kontrolliert. Bei *Azoarcus* sp. BH 72 wurde durch Kolonienform, -beschaffenheit und -farbe, Wachstumszeit, mikroskopische Kontrolle und die Substratspezifität die Reinheit überprüft.

Escherichia coli

-Kulturen wurden durch Stichkulturen in Stammhaltungs-Stichagar (3.2.1) bei 4 °C gelagert. Nährplatten mit ausgestrichenen Kulturen konnten ca. einen Monat bei 4 °C aufbewahrt werden. Desweiteren wurden Glycerinkulturen angelegt. Diese entstanden durch eine 1:1 mit Glycerinpuffer (65 % Glycerin (v/v), 0,1 M $MgSO_4$, 25 mM Tris-HCl, pH 8) vermischte, über Nacht gewachsene Kultur, die danach sofort bei -70 °C eingefroren wurde.

Kulturen von *Azoarcus* sp. BH72 wurden in Röhrchen mit VM-Agar bei 4 °C gelagert, auf dessen Oberfläche sie ausgestrichen worden waren. Außerdem wurden Kulturen in SM-Medium+N (zusätzlich 5 % Dimethylsulfoxid) bei -196 °C gelagert.

Die Stammhaltung des Ascomyceten *A. alternatum* Stamm 2003 erfolgte ausschließlich bei -196 °C in flüssigem Stickstoff, die Reinheitskontrolle wurde anhand morphologischer Merkmale durchgeführt.

3.3 Gaschromatographische Messung der Sauerstoffkonzentration und Acetylen-reduktion

Die Probenahme aus dem Gasraum der mit Gummistopfen gasdicht verschlossenen Kulturen, erfolgte mit gasdichten Spritzen und direktem Einspritzen der Proben in den Gaschromatographen.

Die Sauerstoffkonzentration wurde an einem Gaschromatographen der Firma Konik (Barcelona, Spanien) Modell HRGC-4000A durchgeführt. Das Gerät war mit einer Molekularsiebsäule (5 Å, 80/100 mesh, 2 m Länge, 0,2 cm Innendurchmesser) bestückt, und die Injektor-Temperatur betrug 112 °C. Bei einer

Untersuchungen zur Funktion und Verbreitung

Säulentemperatur von 80°C wurde Helium als Trägergas benutzt. Die Temperatur des angeschlossenen Wärmeleitfähigkeits-Detektors (WLD) lag bei 110°C. Die Chromatogramme wurden über einen nachgeschalteten Integrator (Modell SP4600, Thermo Separation Products, San Jose, California, USA) aufgenommen.

Die Reduktion von Acetylen zu Ethylen als Maß für die Nitrogenaseaktivität der Bakterien wurde durch Messung des gebildeten Reaktionsprodukts Ethylen bestimmt. Die Nitrogenaseaktivität errechnete sich aus der Zunahme an produziertem Ethylen über die Zeit, bezogen auf die Proteinmenge. Verwendet wurde auch der Gaschromatograph der Firma Konik (Barcelona, Spanien), Modell HRGC-4000A, der mit einer Porapak-N 80/100-Säule von 6 Fuß Länge (entspricht 1,82 m) und einem Durchmesser von 0,2 cm bestückt war. Als Trägergas wurde Stickstoff verwendet, die Säulentemperatur betrug 50°C und die Injektortemperatur 112°C. Der Flammenionisationsdetektor (FID) wurde mit H₂ und Druckluft gespeist. Der Detektor hatte eine Temperatur von 220°C. Die Aufzeichnung der Chromatogramme erfolgte mit einem nachgeschalteten Integrator der Firma Thermoseparation Products (Modell SP4600, San Jose, California, USA).

3.4 Standardtechniken für das Arbeiten mit Nukleinsäuren

Das Arbeiten mit Nukleinsäuren erfolgte, soweit nicht anders angegeben, nach in Ausubel *et al.* (1987) angegebenen Standardprotokollen.

3.4.1 Allgemeine Standardmethoden

Allgemeine Standardmethoden wie Sterilisation von Lösungen, Gefäßen und Gebrauchsmaterial sowie Ethanol-fällung oder Phenolextraktion wurden, wenn nicht anders aufgeführt, nach Standardprotokollen (Ausubel *et al.*, 1987) durchgeführt.

3.4.2 Isolierung von Nukleinsäuren

3.4.2.1 Isolierung genomischer DNA aus *Azoarcus* sp. BH72

(Hurek *et al.*, 1993, modifiziert nach Dhaese *et al.*, 1979)

Eine über Nacht gewachsene Bakterienkultur von 1,5 ml Volumen wurde abzentrifugiert (1 min, Raumtemperatur, 15000xg). Der Überstand wurde dekantiert und die Zellen in 1 ml TES-Puffer (3.1.2) gewaschen. Anschließend wurde zu dem Zellsediment 1 ml TE-Puffer (3.1.2) zugegeben und anschließend, ohne Resuspendieren der Zellen, wieder abgenommen. Nun wurden die Zellen in 100 µl TE-Puffer resuspendiert, 300 µl N-Lauroylsarkosin (5%ig in TE-Puffer (3.1.2) gelöst) und Pronase E (2,5 mg/ml) zugegeben. Der Ansatz wurde eine Stunde bei 37°C inkubiert und dabei zwischenzeitlich mehrmals kräftig durchmischt. Um die sehr viskose DNA zu scheren, wurde der Ansatz dann ca. 20 s auf einem Vortexmischer kräftig durchmischt. Anschließend erfolgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion (3.4.1). Daran schloß sich die Fällung der DNA durch Zugabe von 1/9 Volumen Natriumacetat-Lösung (3 M, pH 5,3) und zwei Volumen kaltem Ethanol an. Der Fällungs-Ansatz wurde gemischt, 10 min auf Eis inkubiert und 15 min bei 4°C und 13000xg zentrifugiert. Die gefällte DNA wurde mit je 1ml 70%igem Ethanol bei Raumtemperatur zweimal gewaschen. Abschließend wurde die gefällte DNA unter Vakuum getrocknet, in 30-50 µl TE-Puffer aufgenommen und bei -20°C gelagert.

3.4.2.2 Standardverfahren zur Plasmidpräparation und Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Die Standardpräparation von Plasmiden beruht auf der Methode von Birnboim und Doly (1979) und wurde nach dem modifizierten Protokoll (Ausubel *et al.*, 1987) durchgeführt. Wurden größere Mengen

Untersuchungen zur Funktion und Verbreitung

Plasmid-DNA extrahiert oder besonders reine DNA zur Sequenzierung benötigt, so wurde die Plasmid-Präparation mit DNA-bindenden Säulen (tip20, tip 100) von Qiagen (Hilden) eingesetzt. Die Isolierung beruht auf der Anleitung von Birnboim und Doly (1979), kombiniert mit Säulen, die mit Anionenaustauscher-Harz gefüllt sind, an die die DNA spezifisch bindet. Die Präparation erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die DNA-Präparation aus dem Agarosegel erfolgte durch die Bindung an eine Silica-Matrix ("Gene clean", BIO 101, La Jolla, USA) und wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.4.3 Klonierung

Bei der Klonierung kamen je nach Versuchsziel verschiedene Strategien zur Anwendung. Klonierungen und Subklonierungen wurden in *E. coli* DH5 α durchgeführt, wobei pUC19, pBlueskript-II KS+ sowie pBBRMCS III als Vektoren benutzt wurden. Transformiert wurde durch Elektroporation oder durch CaCl₂-Behandlung und Hitzeschock der Zellen. Die gezielte Integration vorher in *E. coli* klonierter DNA in das Chromosom von *Azoarcus* sp. BH72 erfolgte über homologe Rekombination.

3.4.3.1 Klonierungsvektoren

In der vorliegenden Arbeit wurden die Klonierungsvektoren pUC19, pBlueskript-II KS+ sowie pBBRMCS III verwendet.

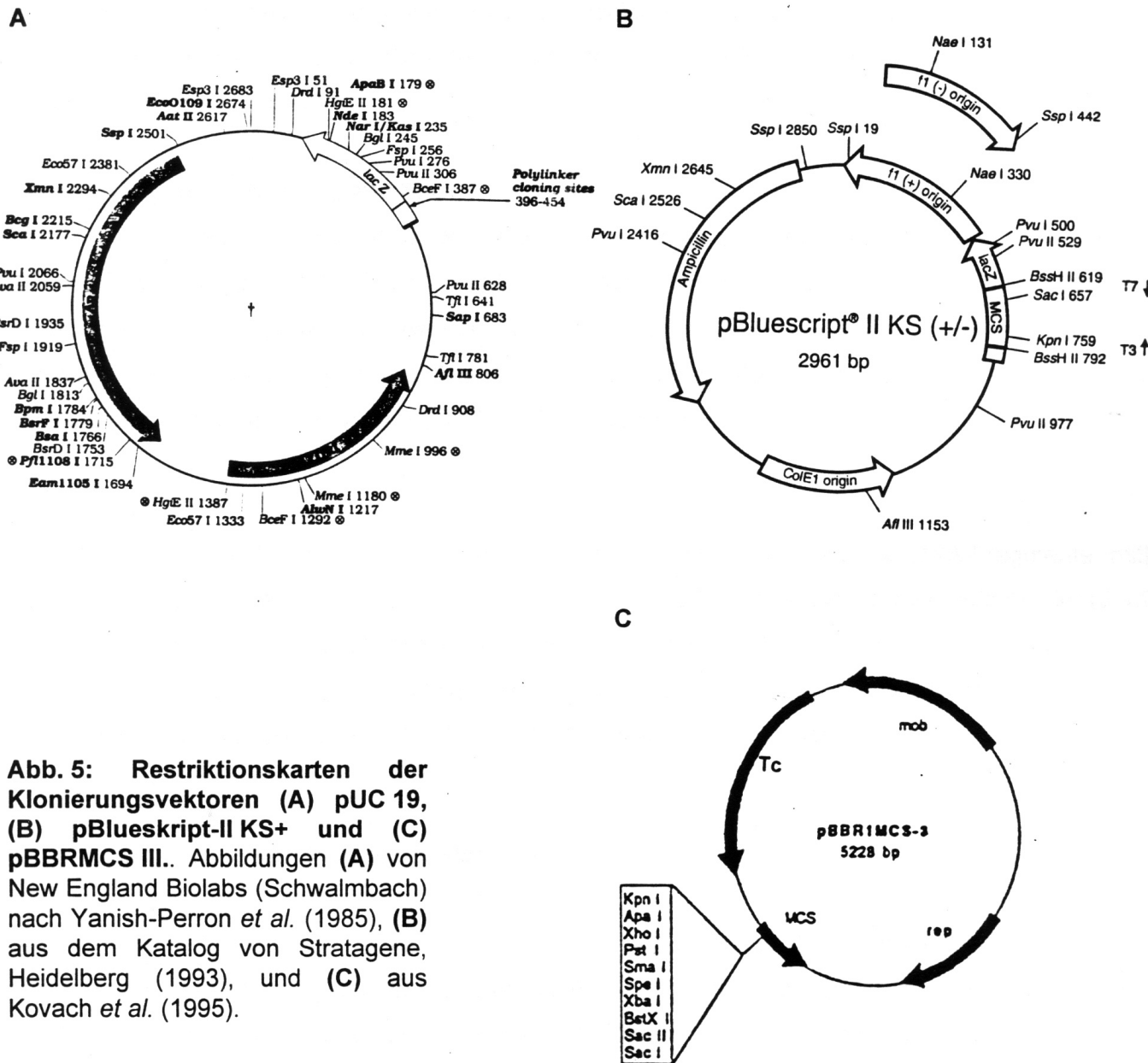


Abb. 5: Restriktionskarten der Klonierungsvektoren (A) pUC 19, (B) pBlueskript-II KS+ und (C) pBBRMCS III.. Abbildungen (A) von New England Biolabs (Schwalmbach) nach Yanish-Perron *et al.* (1985), (B) aus dem Katalog von Stratagene, Heidelberg (1993), und (C) aus Kovach *et al.* (1995).

3.4.3.2 Konstruktion von klonierten Plasmiden

Durch Restriktionsverdau des Vektors und des zu klonierenden DNA-Fragments wurden in der Regel miteinander kompatible Enden (bei kohäsiven Enden also zueinander passende Basensequenzen der Einzelstrangüberhänge) für die Klonierung hergestellt. War dies nicht möglich, wurden kohäsive Enden enzymatisch in glatte Enden umgewandelt. Anschließend wurden geschnittener Vektor und zu klonierendes Fragment durch Agarosegelelektrophorese von unerwünschter DNA getrennt (z.B. geschnittener Vektor von ungeschnittenem), aus der Agarose isoliert und miteinander ligiert. Der Ligationsansatz konnte dann in *E. coli* transformiert (siehe 3.6.1) werden.

Restriktionsverdau

Untersuchungen zur Funktion und Verbreitung

Für die Klonierung eines bereits in einem Plasmid vorliegenden Fragments wurden 300 ng Vektor sowie 2 - 4 µg Plasmid geschnitten, welches den zu klonierenden DNA-Bereich trug. Die Durchführung erfolgte wie unter 3.9.4 beschrieben.

Umwandlung kohäsiver in glatte Enden

Falls für die Klonierung erforderlich, wurde die Umwandlung von kohäsiven in glatte Enden mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I durchgeführt, mit dessen 3'→ 5'-Exonukleaseaktivität überhängende 3'-Enden entfernt werden konnten (5 U bei 37 °C für 30 min), während die 5'→ 3'-Polymeraseaktivität des Enzyms zum Auffüllen überhängender 5' -Enden genutzt wurde (15 min bei 30 °C unter Zugabe von jeweils 1 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP).

Ligation

Wie oben beschrieben wurden vorbehandelter Vektor und zu klonierende DNA-Fragmente mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt (siehe 3.5.1), anschließend aus der Agarose aufgereinigt (3.4.2.2) und für die Ligation eingesetzt. Die Ligation von DNA erfolgte für 12 - 14 h bei 14 °C in 10 - 20 µl Gesamtvolumen mit 1 U T4-Ligase (Gibco BRL, Eggenstein) in speziellem Ligationspuffer (15% Ficoll 400 (w/v), 20 mM Tris-HCl pH 7.6, 10 mM MgCl₂, 10 mM Dithiothreitol, 1.2 mM ATP).

3.4.4 Klonierung von PCR-Produkten

Um PCR-Produkte klonieren zu können, mußten vorher durch die Polymerase-Aktivität des Klenow-Fragments der Polymerase I aus *Escherichia coli* die kohäsiven Enden der Fragmente aufgefüllt werden (3.4.3.2). Dieser Ansatz wurde dann mit einem Volumen Chloroform/Phenol/Isoamylalkohol (50:49:1) extrahiert, mit Acetat und Ethanol über Nacht bei -20°C gefällt (3.4.2.1), abzentrifugiert (15 min / 4°C / 11000xg), das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in die Ligation eingesetzt. Der Vektor wurde mit dem glatte Enden erzeugenden Restriktionsenzym *Hinc* II geschnitten, auf ein Agarose-Gel aufgetragen, die Bande in der richtigen Größe ausgeschnitten, mit Gene clean (3.4.2.2) aufgereinigt und in die Ligation eingesetzt (3.4.3.2).

3.5 Elektrophoretische Auftrennung von DNA

3.5.1 Agarosegel-Elektrophorese

Je nach gewünschtem Auftrennungsgrad (siehe Tabelle 5) wurden 0,8 - 1,5 % agarosehaltige Gele in Tris-Acetatpuffer (TAE) bzw. Tris-Boratpuffer (TBE) gegossen.

Tab. 5: Bereich optimaler Auflösung linearer DNA-Fragmente im Agarosegel in Abhängigkeit vom Agarosegehalt

(gekürzt nach Ausubel *et al.* (1987));

Agarose-Gehalt Größe linearer DNA-Fragmente, für

Untersuchungen zur Funktion und Verbreitung

die eine optimale Auflösung erreicht wird

H,7 % I2-0,8 kb

I,0 % I0-0,5 kb

I,2 % 7-0,4 kb

I,5 % 3-0,2 kb

Der DNA, die meist als Restriktionsansatz vorlag, wurde Ladepuffer als 10x konzentrierte Stammlösung im Verhältnis 1:10 zugegeben. Die Gelelektrophorese erfolgte in horizontalen Gelkammern mit TAE-Puffer bzw. TBE-Puffer als Laufpuffer. An die Gelkammer wurde eine Spannung von 3,5-5 V/cm angelegt. Die Elektrophoresedauer richtete sich nach der gewünschten Auflösung, die anhand der zugegebenen Farbindikatoren im Ladepuffer abgeschätzt werden konnte.

Zum Färben nach der Gel-Elektrophorese wurden die Gele 20 min in einer wässrigen Ethidiumbromidlösung (0,5 µg/ml) schüttelnd inkubiert und anschließend mit Wasser abgespült. Zur Dokumentation wurden die Gele unter UV-Licht bei 302 nm photographiert.

Ladepuffer

(Endkonz.): J % Ficoll 400, 0,01 % Bromphenolblau, 0,01 % Orange G, 0,01 % Xylencyanol,
0,1 mg/ml Ribonuklease A

TAE (Tris-Acetat)-Puffer

:H,04 M TRIS-Acetat, 0,004 M EDTA

TBE (Tris-Borat)-Puffer

:L5 mM TRIS-Borat, 1 mM EDTA

3.5.2 Elektrophoretische Auftrennung von PCR-Produkten in Polyacrylamidgelen

Kleine DNA-Fragmente aus PCR-Ansätzen wurden mit 5%igen Polyacrylamid-Gelen vertikal elektrophoretisch aufgetrennt. Dazu wurde das Minigel-System von Biometra (Göttingen) verwendet. Als Größenstandard wurde pBR322/*Msp* I (New England Biolabs, Bad Schwalbach) aufgetragen. Es wurde eine Spannung von 80 V über einen Zeitraum von 90 min angelegt. Dieser Wert war auf die optimale Auftrennung der gewünschten Werte optimiert. Abschließend wurden die Gele 10 min in einer wässrigen Ethidiumbromidlösung (0,5 µg/ml) schüttelnd inkubiert, mit Wasser abgespült und zur Dokumentation photographiert. Der Transfer auf eine Membran (Hybond N, Amersham Lifescience, Braunschweig) wurde mit Hilfe eines Elektrobotters, Modell Trans-Blot SD (BioRad, München) mit einer Spannung von 0,8 mA/cm² über eine Dauer von 4 h durchgeführt (Ausubel *et al.*, 1987). Nach dem Transfer wurde die Membran 10 min. auf einem mit 0,4 M NaOH getränkten Filterpapier inkubiert, kurz in 2XSSC gewaschen und die DNA auf der Membran durch UV-Bestrahlung fixiert (3.7.1). Danach konnte die Membran mit einer Sonde hybridisiert werden (3.7).

3.6 Transformationsverfahren

Untersuchungen zur Funktion und Verbreitung

3.6.1 Transformation durch CaCl_2 und Hitzeschock

Die beschriebenen Verfahren zur Herstellung kompetenter Zellen sowie die Durchführung der Transformation wurden nach Kushner (1978) durchgeführt. Für die Herstellung kompetenter *E. coli* - Zellen für die Transformation durch Hitzeschock wurden zunächst 80 ml-Kulturen in LB^+ -Medium bis zu einer OD_{578} von 0,4 auf dem Schüttler (50 cm Hub) bei 200 Upm und 37 °C gezogen. Alle folgenden Schritte erfolgten auf Eis oder bei 4 °C. Nach Ernte der Zellen durch 5 minütiges Zentrifugieren bei 4000 x g und vorsichtigem Resuspendieren in 20 ml TF 1, folgte ein erneuter Zentrifugationsschritt (5 min, 4000 x g) mit anschließendem Resuspendieren der Zellen in 2 ml TF 2. Die erhaltenen kompetenten Zellen wurden bei -70 °C gelagert. Die durchschnittlich erreichte Kompetenz der Zellen lag zwischen 10^6 und 10^7 Transformanten pro μg DNA. Zur Transformation durch Hitzeschock wurden frisch aufgetaute kompetente Zellen einer OD_{578} von etwa 16 in 100 μl TF 1-Lösung zusammen mit dem zu transformierenden Plasmid (in maximal 10 μl Volumen) 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock durch 2 minütige Inkubation bei 42 °C, nach der sofort 1 ml LB -Medium zugegeben wurde. Die Zellen wurden zur Ausprägung ihrer durch die Transformation erworbenen Antibiotika-Resistenzen eine Stunde bei 37 °C inkubiert und anschließend auf ein Selektiv-Medium ausplattiert.

TF 1-Lösung: 10 mM 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäuremonohydrat, 50 mM MnCl_2 , 10 mM CaCl_2 , 100 mM RbCl

TF 2-Lösung: 10 mM Piperazin-N-N'-bis(2-Ethansulfonsäure), 75 mM CaCl_2 , 75% Glycerin

3.6.2 Elektrotransformation von *Azoarcus* sp. BH72

(Reinhold-Hurek und Hurek, unpublizierte Daten)

Zur Herstellung elektrokompeter *Azoarcus* sp. BH72-Zellen wurde eine 20 ml Vorkultur in VM-Ethanolmedium angesetzt und über Nacht bei 37°C wachsen gelassen. Mit dieser Vorkultur wurden 500 ml VM-Ethanol-Medium angeimpft und bis zu einer OD_{578} von 0,5 geschüttelt. Die gewachsene Kultur wurde nun bei 4000xg 5 min abzentrifugiert und das Zellsediment in 100 ml 10 %iger Glycerin-Lösung (in aqua bidest) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde erneut bei 4000xg 5 min abzentrifugiert und das Zellsediment in 20 ml Glycerin-Lösung aufgenommen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt unter den gleichen Konditionen wurden die Zellen in 400 μl Glycerin resuspendiert, in 100 μl -Portionen aliquotiert und entweder bei -70°C eingefroren oder gleich zur Elektroporation verwendet. Zur Transformation wurden zu den eisgekühlten, elektrokompenten Zellen 4-7 μg DNA bzw. Ligationsansatz gegeben. Die zu elektroporierende DNA mußte vor der Elektroporation dialysiert werden. Zellen und DNA wurden zusammen mindestens 10 min auf Eis inkubiert, ehe sie in die eisgekühlte Elektroporationsküvette (1mm Spalt, Eurogentec, Belgien) pipettiert wurden. Der Puls wurde mit folgenden Einstellungen des Elektroporationsgerätes gegeben: 25 μF , 200 Ω , 2,5 kV. Anschließend wurde sofort 1 ml VM-Medium zugegeben, die Zellen mit dem Medium gemischt, in ein 15 ml Sarstedt-Reaktionsgefäß überführt und 90-120 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen auf Selektivmedium ausplattiert und zwei Tage bei 37°C inkubiert.

3.7 Hybridisierungstechniken

3.7.1 Transfer der DNA aus dem Agarosegel auf eine Membran nach dem Kapillartransfer- Verfahren

(Southern, 1975)

Die zu hybridisierende DNA wurde in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (3.6). Das Gel wurde mit Ethidiumbromid gefärbt (3.6.4) und photographiert (3.6.5). Um die DNA aus dem Gel auf die Membran zu transferieren, mußte die DNA denaturiert werden. Enthielt das Gel DNA-Fragmente mit einer Größe von

Untersuchungen zur Funktion und Verbreitung

mehr als 10 kb, so wurden diese durch 10 minütige Inkubation des Gels mit 0,25 M HCl depurinisiert. Danach wurde das Gel zweimal 20 min mit Denaturierungslösung (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH) sowie zweimal 20 min mit Neutralisierungslösung (1,5 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl pH 7,2, 0,001 M Na₂-EDTA) gewaschen. Die Waschschritte erfolgten jeweils bei RT auf einem Kippschüttler. Danach wurde die DNA durch das DNA-Kapillartransfer-Verfahren nach Southern (1975) aus dem Gel auf eine Nylon-Membran (Hybond N, Amersham Lifescience, Braunschweig) übertragen. Der Transfer erfolgte für 4-12 h bei Raumtemperatur. Nach dem Transfer wurde die transferierte DNA auf der Membran durch UV-Bestrahlung (Fluolink, Biometra, Göttingen) der Energieabgabe von 0,4 J/cm² auf der Membran fixiert. Anschließend konnte die Membran direkt hybridisiert oder bei -20°C gelagert werden.

3.7.2 Hybridisierung mit Digoxigenin-markierten Sonden

Zur Digoxigenin-Markierung der Sonde sowie der Signal-Detektion wurde folgendes System verwendet: DIG-DNA Labeling & Detection Kit, Boehringer Mannheim, Mannheim. Das Digoxigenin Markierungs- und Detektionssystem beruht auf der Markierung der Sonden mit Digoxigenin, einem Steroid-Hapten, das an dUTP gebunden ist. Bei der Markierungsreaktion dienen zufällig zusammengesetzte Hexanukleotide als Primer, die sich an die denaturierten DNA-Stränge anlagern. Durch Synthese des Gegenstrangs mittels des Klenow-Fragments der Polymerase I wird das an dUTP gebundene Digoxigenin in die DNA eingebaut. Zur Herstellung von digoxigeninmarkierten homologen Sonden durch PCR wurde der PCR-Reaktion digoxigeninmarkiertes dUTP in einer Konzentration von 14 µM zugesetzt (3.9). Die so markierten Sonden binden an membrangebundene homologe DNA. Die hybridisierten Sonden können mit Anti-Digoxigenin-Antikörpern detektiert werden, an die eine alkalische Phosphatase gebunden ist. Durch Zugabe der Substrate 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat und Nitroblau-Tetrazoliumsalz wird in einer Enzym-katalysierten Farbreaktion die hybridisierte Ziel-DNA nachgewiesen. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Hybridisierung sowie die Posfwaschungen mit den durch PCR amplifizierten Sonden BR10/MS2, BR54/MS1 und MSAQF/MSAQR erfolgen wie bei homologen Sonden.

3.8 Analyse von Gesamtproteinen

3.8.1 Extraktion von Gesamtproteinen zur zweidimensionale Gelelektrophorese

Für den Einsatz in die zweidimensionale Gelelektrophorese erfolgte die Proteinextraktion ohne geladene Detergenzien wie SDS. Die Zellsedimente von 20 bis 100 mg Feuchtzellmasse wurden in 1 ml Protein-Extraktionspuffer (0,7 M Saccharose, 0,5 M Tris, 30 mM HCl, 0,1 M KCl, 2,0% β-Mercaptoethanol) gelöst, mit Ultraschall (Branson Sonifier, Modell 250) bei 35 Watt Leistung mit fünf Wiederholungen von je 30 s mit jeweils 90 s Pause unter Eiskühlung aufgeschlossen. Der Zellaufschluß wurde 30 min auf Eis inkubiert, 5 min bei 9000xg und 4°C abzentrifugiert, der Überstand mit jeweils 700 µl Phenol gemischt und erneut 30 min auf Eis inkubiert. Nach Erreichen einer klaren Phasentrennung durch 10 minütiges Abzentrifugieren bei 13000xg und 4°C wurde die phenolische Phase abgenommen. Dabei wurden 5 Volumen Präzipitations-Puffer (0,1 M Ammoniumacetat in Methanol) zugegeben, durchmischt und 12 - 14 h bei -20°C gefällt. Nach erneutem Mischen des Ansatzes wurde, falls benötigt, ein Aliquot für die Proteinbestimmung abgenommen, die restliche Lösung bei 4°C mit 4500xg 10 min abzentrifugiert, der Überstand abgeschüttelt, das Präzipitat an der Luft getrocknet und anschließend in "Protein-Sample"-Puffer (9,5 M Harnstoff, 2,0% Nonidet P40 (Sigma), Ampholine pH 3.5 - 10 (LKB), 100 mM Dithiotereitol) gelöst. Die erhaltene Proteinlösung wurde bei -80 °C gelagert.

3.8.2 Extraktion von Gesamtprotein zur Westernblot-Analyse

Zum Einsatz in die Westernblot-Analyse wurde die Extraktion der zellulären Proteine alternativ unter Zusatz von SDS durchgeführt. Dabei wurden zunächst 150 mg Feuchtzellmasse in 1 ml PBS-Puffer (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na₂HPO₄ × 7 H₂O, 1,4 mM KH₂PO₄, pH 7,3) gewaschen und das Zellsediment in 1 ml Extraktionspuffer aufgenommen. Die Lyse erfolgte nach Zugabe von 0,1 ml 20%iger SDS-Lösung und einer

Untersuchungen zur Funktion und Verbreitung

15 minütigen Inkubation bei 95 °C. Nach Abkühlen auf Eis und Abzentrifugieren der Zelltrümmer wurde der Überstand bei - 20 °C gelagert.

Die Proteinbestimmung wurde mit dem BioRad-Protein-Assay (BioRad, München) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.8.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Westernblot-Analyse

Die wie unter 3.8.2 beschrieben extrahierten Proteine wurden in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) aufgetrennt. Die Elektroelution auf Nitrocellulosemembranen (BB 85, Schleicher und Schuell, Dassel) wurde mit Hilfe eines Elektrobloppers, Modell Trans-Blot SD (BioRad, München), für 45 min bei einer angelegten Spannung von 8 V durchgeführt (Blot-Puffer: 14.4 g/l Glycin, 3.0 g/l Tris, 0.94 ml/l SDS (20%), 500 ml/l Methanol). Das Eisenprotein der Nitrogenase von *Azoarcus* wurde auf den so erhaltenen Western-Blots mit spezifischem Antiserum gegen das Eisenprotein der Nitrogenase von *Rhodospirillum rubrum*, das uns freundlicherweise von R. Ludden zur Verfügung gestellt worden war, nachgewiesen. Um eine unspezifische Bindung der Antikörper an die Nitrocellulosemembran zu vermeiden, wurde diese zunächst mit 5% Milchpulver in TBS-Puffer (10 mM Tris-HCl-Puffer pH 7.5, 150 mM NaCl) abgesättigt. Nach Zugabe der Anti-NifH-Antikörper und Inkubation (12 - 14 h) unter leichtem Schütteln im Kühlraum wurde der Blot 5 × 6 min in TBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurde das Antikörper-Peroxidase-Konjugat (DAKO Immunglobulines, Hamburg) in einer Konzentration von 10 µl/10 ml zugegeben und zwei Stunden inkubiert. Nach erneutem Waschen der Membran (5 × 6 min. in TBS-Puffer) erfolgte die chemilumineszente Detektion mit dem ECL Western blotting detection kit (Amersham Lifescience, Braunschweig) nach Angaben des Herstellers.

3.8.4 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Bei der zweidimensionalen Gelelektrophorese werden die aufgetragenen Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt (erste Dimension) sowie anschließend nach ihrem Molekulargewicht (zweite Dimension) aufgetrennt, was das Auflösungsvermögen dieser Methode vor allem bei der Auftrennung komplexer Gemische, wie beispielsweise von Gesamtzellprotein, gegenüber den eindimensionalen Elektrophoresen deutlich erhöht.

3.8.4.1 Erste Dimension

Die isoelektrische Fokussierung (IEF) der Proteine in der ersten Dimension erfolgte mit einigen Veränderungen wie von Görg *et al.* (1988) beschrieben. Die technische Durchführung der isoelektrischen Fokussierung erfolgte nach Angaben des Herstellers (Pharmacia Biotech, Freiburg). Es wurden IEF-Streifen mit einer Länge von 18 cm und einem pH-Gradienten von 3 - 10 verwendet (Pharmacia Biotech, Freiburg) und eine Proteinmenge von 80 - 100 µg eingesetzt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte mit dem Multiphor II Elektrophoresis System von Pharmacia Biotech (Freiburg) im Modus "Gradient" (500Vh / 2000Vh / 10.000Vh / 22400Vh).

3.8.4.2 Zweite Dimension

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese der zweiten Dimension wurde mit einigen Änderungen nach O'Farrell (1975) durchgeführt. Zur elektrophoretischen Auftrennung wurde das Elektrophorese-System Protean II xi 2D-Cell (BioRad, München) verwendet. Die Gele (siehe auch Tabelle 4) liefen für 12-14 h bei 50 V in Laufpuffer (0.025 M Tris, 0.192 M Glycin, 0.1% SDS; pH 8.4). Als Proteinmarker wurde Rainbow coloured protein molecular weight marker (Amersham Lifescience, Braunschweig) verwendet. Die Färbung der Polyacrylamidgele erfolgte mit der Silberfärbungs-Methode nach Blum *et al.*, 1987. Die Gele wurden abschließend in "Gel-Storage"-Puffer (18% Ethanol und 3% Glycerin in H₂O) bei 4°C gelagert.

Untersuchungen zur Funktion und Verbreitung

Tabelle 4: Zusammensetzung des Polyacrylamidgels (für 4 große Gele):

Sammelgel (5%)	Trenngel (12,5%)
7,2 ml Acrylamid 40%	55,9 ml Acrylamid 40%
3,6 ml Bisacrylamid 2%	29,8 ml Bisacrylamid 2%
10 ml Sammelgelpuffer ^a	45,4 ml 1,5 M Tris pH 8,8
24,6 ml <i>aqua demin.</i>	1,9 ml SDS 10%
0,100 ml APS (10%)	50 ml <i>aqua demin.</i>
0,016 ml TEMED	0,466 ml APS (10%)
	0,091 ml TEMED

a

Sammelgelpuffer (4x): 0,5 M Tris, 0,4% SDS; pH 6,8

3.9 DNA-Amplifizierung mit der Polymerase-Ketten-Reaktion

Der verwendete PCR-Puffer (Hurek *et al.*, 1993) setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen:

10x PCR-Puffer TH

200 mM Tris-HCl, pH 8,7

15 mM MgCl₂

100 mM KCl

1 mg/ml BSA; acetyliert, nucleasenfrei

0,05 % (v/v) Tween 20 (Fluka, Buchs)

Durchführung

In 0,5 ml Reaktionsgefäßen wurde 50 µl Reaktionsgemisch angesetzt; zu 5 µl PCR-Puffer wurden 5 µl Desoxynukleotide (500 µM der Desoxynukleotide dATP, dCTP, dGTP und dTTP), je 0,5 µl der beiden Primer (50 µM), 0,25 µl Taq-Polymerase (5 U/µl, Beckman, München), MgCl₂ (100mM Stammlösung) und Matrizen-DNA zugegeben. Chromosomale DNA wurde zu einer Konzentration von 10-100 ng/ml, Plasmid-DNA in einer Konzentration von 1-20 ng zugegeben. Der Ansatz wurde nach Auffüllen mit *aqua bidest* mit Mineralöl überschichtet. Für den Kolonieschnelltest (Hurek und Reinhold-Hurek, 1995a) wurde eine Kolonie von *Azoarcus* sp. in 50 µl *aqua bidest* suspendiert, 10 min gekocht, auf Eis abgekühlt und 5 min bei 15000xg und 4°C abzentrifugiert. Es wurden je 2 µl des Überstandes in die PCR eingesetzt. Die Schmelztemperatur T_m des jeweiligen verwendeten Primers benötigt für die Temperaturwahl in der Primeranlagerungsphase der PCR wurde nach folgender, empirischer Formel berechnet (Sambrook *et al.*, 1989):

$$T_m = 81,5^{\circ}\text{C} + 0,41 \times (\%GC) - 600/N + 16,6 \times \log M$$

Untersuchungen zur Funktion und Verbreitung

Mit N als Anzahl der Nukleotide des Primers und log M als dem dekadischen Logarithmus der Molarität der Na⁺ und K⁺-Konzentration (Sambrook *et al.*, 1989). Die tatsächliche Temperatur in der Primeranlagerungsphase wurde 2 bzw. 5°C unter der niedrigeren der errechneten Schmelztemperaturen des jeweiligen Primerpaares gewählt. Die Temperaturbedingungen der PCR wurden für in Tab. 6 aufgeführte Primer wie folgt gewählt: Die Proben wurden 4 min bei 94°C denaturiert. Dabei wurde zuerst gewartet bis sich das PCR-Gerät auf 94°C erhitzt hatte, dann wurden die Reaktionsgefäße in den Heizblock des PCR-Gerätes hineingestellt. Nun erfolgte bei 58°C die Anlagerungsphase, die 2 min dauerte. Danach lief 2 min bei 72°C die Polymerisationsphase ab. Jetzt erfolgte erneut die Denaturierungsphase, die aber wie die folgenden nur noch 1 min anhielt. Die einzelnen Phasen liefen nacheinander folgend 30 Zyklen ab. Abschließend erfolgte eine 4minütige Elongationsphase bei 72°C. Die Proben wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei 4°C gelagert. Die in dieser Arbeit als Primer verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 6 aufgezeigt.

Tab. 6: In dieser Arbeit für PCR sowie Oligonukleotidhybridisierung verwendete Primer.

T_m-Berechnung bezogen auf ^a PCR-Puffer TH, ^b auf Reaktionspuffer der Tth-DNA-Polymerase zur Primer extension (3.10).

Name	Sequenz (5' → 3')	Anzahl Nukleotide	T _m /°C
BR10	GGAATTCCGGTTTGTGTGACTTTCGCCA	J8	N8,6 ^a
BR30	CCAGCACCAACGGA	I4	L2,7 ^b
BR54	AAGATCTCCAAGGAGCCGATC	J1	N0,6 ^a
BR55	GTGGTTTCCCGGCGCAAGGCACATCGAAA	J9	N7,7 ^b
MS1	GGGAGTCGAACCCAGCACCAACGG	J5	N9,2 ^a
MS2	TTTCGATGTGCCTTGCGCCGGGAAACCAC	J9	M8,6 ^a
MS9	GGACC(CT)TTAGCTCAG	I6	M1,4 ^a
MS10	ACT(CT)GAACC(AT)(AG)(CT)GACC	I6	M2,5 ^a
MSAQF	CGAAATGGTGACCTTGCCGT	J0	N0,75 ^a
MSAQR	CAGGTTTGCATGATGTTCTT	J0	N0,75 ^a

3.10 Bestimmung des 5'-Ende eines Transkriptes

Die Primer extension-Methode zur Bestimmung des 5'-Endes wurde aus Sambrook *et al.* (1989) mit kleinen Änderungen entnommen. Zur Anlagerung der Primer wurden 54 µg RNA, 2,5 pmol Primer sowie 20x Reaktionspuffer in aqua bidest. angesetzt, 2 min bei 70°C inkubiert und langsam wieder bis auf 42°C abgekühlt. Die Einlagerung der radioaktiven Nukleotide in der cDNA-Transkription erfolgte durch Zugabe von 2,5 µl 10x Markierungsmix, 2 µl [³⁵S] -ATP (spezifische Aktivität von 370 kBq/µl, Amersham Lifescience, Braunschweig) und 10 U reverse Transkriptase (Boehringer Mannheim, Mannheim) zu 20 µl des Anlagerungsansatzes. Dieser Reaktionsansatz wurde 30 min bei 63°C inkubiert, dann 1 µl Chase-Lösung zugegeben und weitere 30 min inkubiert. Zur Probenfällung und Ankonzentrierung wurden 175 µl TES (10mM TRIS-HCl pH 7,5, 1mM EDTA pH 8,0, 50 mM NaCl) und 200 µl CPI (50 % v/v Phenol pH 7,5, 49% v/v Chloroform, 1% Isoamylalkohol) zugegeben, gemischt und die Phasen durch kurze Zentrifugation getrennt. Die DNA aus der oberen Phase wurde mit Ethanol fällung gefällt und in 6 µl aqua demin. und 4 µl

Untersuchungen zur Funktion und Verbreitung

Stopplösung (Pharmacia, Freiburg) aufgenommen und in die Sequenzierungs-Gelelektrophorese eingesetzt.

10x Reaktionspuffer

: 340 mM Tris-HCl pH 8,8, 500 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, 50 mM DTT

10x Markierungsmix

: 1,25 mM dCTP, 1,25 mM dGTP, 1,25 mM dTTP in 1x Reaktionspuffer

Chase-Lösung

: 25 mM dATP, 25 mM dCTP, 25 mM dGTP, 25 mM dTTP in 1x Reaktionspuffer

3.11 *in vitro*-Transkription

In die *in vitro*-Transkription wurden 4 µg Plasmid-DNA des Plasmidkonstrukts pBlueSF48 eingesetzt. Zur Linearisierung des Plasmids vor der Transkription mit der T7-Polymerase wurde das Restriktionsenzym *Hinc* II verwendet. Die *in vitro*-Transkription des *Aquaspirillum delicatum*-Transkripts wurde mit dem RNA Transcription kit (Stratagene, Heidelberg) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Die Ansätze wurden auf ein 6%iges Polyacrylamidgel aufgetragen und bei 8V/cm für 4 h aufgetrennt. Danach wurde das Gel getrocknet und ein Kodak-Film (Kodak X-OMAT XAR-5, Rochester, NY, USA) damit belichtet.

3.12 Sequenzierung

3.12.1 Manuelle Sequenzierung

Die radioaktive DNA-Sequenzierung erfolgte nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977). Die Sequenzierung wurde mit dem "70770 Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing Kit" (Amersham Lifescience, Braunschweig) durchgeführt. Die zu sequenzierenden DNA-Proben wurden mit Quiagen-Säulen (3.4.2.3) aufgereinigt. Eingesetzt wurden jeweils 6 µg eines 3,2 kb großen Fragmentes, bei größeren Fragmenten wurde entsprechend mehr DNA verwendet. Die Sequenzierung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Das Sequenziergel wurde als 8%ige "GENE-PAGE"-Lösung (Amresco; Solon, Ohio, USA) fertig bezogen. Zur Einleitung der Polymerisierungsreaktion wurden zu 100 ml, 150 µl 6,6 M TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin) und 450 µl 10 %iges Ammoniumpersulfat zugegeben. Das Gel wurde als Keilgel zwischen zwei Glasplatten von 24 x 52 cm Größe gegossen. Eine der Glasplatten war beheizbar (Thermoplatte; Pharmacia Biotech, Freiburg). Die Stärke des Gels lag zwischen 0,09 mm (oben) und 0,27 mm (unten). Benutzt wurde das "Macrophor Sequencing System" (Pharmacia, Freiburg). Die Gelelektrophorese erfolgte bei 55°C. Als Laufpuffer diente TBE-Puffer (3.5.1). Die angelegte Spannung betrug 1800-2200 V. Die Elektrophorese erfolgte je Probe einmal über ca. 2,5 Stunden (kurzer Lauf) und einmal über 5-6 Stunden (langer Lauf). Zur Exposition wurde auf das Sequenziergel ein Röntgenfilm (X-ray NIF-RX, 18 x 43 cm, Fuji, Japan) aufgelegt, 2-5 Tage exponiert und dann entwickelt.

3.12.2 Sequenzierung mit Hilfe eines automatischen Sequenziergerätes

Mit dem "ALF express DNA sequencer" (Pharmacia Biotech, Freiburg) können fluoreszenz-markierte DNA-Moleküle, die gelelektrophoretisch aufgetrennt wurden, detektiert werden. Während der

Untersuchungen zur Funktion und Verbreitung

Gelelektrophorese regt ein Laserstrahl, der rechtwinklig zur Bewegungsrichtung der DNA-Fragmente positioniert ist, diese zur Lichtemission an. Das Licht wird von Photosensoren, die sich hinter den einzelnen Spuren des Gels befinden, detektiert. Alle Sensorsignale werden miteinander verglichen und daraus schließlich die Sequenz ermittelt. Die Sequenzierungsreaktionen mit fluoreszierenden Primern oder fluoreszenz-markierten Nukleotiden (Synthese durch Pharmacia, Freiburg) wurden mit Hilfe der Thermozyklussequenzierung und Standardprimern (T3, T7) durchgeführt. Zur Gelelektrophorese wurde ein "Hydrolink Long ranger Gel" (Serva, Heidelberg) benutzt. Die Methode der Thermozyklus-Sequenzierung basiert auf einer Polymerasekettenreaktion in Anwesenheit von Didesoxynukleotiden. Dabei wird jedem der vier Reaktionsansätze ddATP, ddCTP, ddGTP oder ddTTP zugegeben und eine PCR durchgeführt. Die Thermozyklus-Sequenzierung wurde mit dem "Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP" (Amersham, Braunschweig) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Amplifikation der DNA und die Termination erfolgten in 25 Zyklen, die aus Denaturierungsphase (95°C, 30 s) und einer kombinierten Primeranlagerungs- und Elongationsphase (60°C, 30 s) bestanden. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 3,5 µl denaturierender Stop-Lösung (Pharmacia, Freiburg) beendet und die Proben anschließend auf das Gel aufgetragen.

3.13 Nachweis der Lebensfähigkeit von *Azoarcus*-Zellen durch *in vivo*- Fluoreszenzfärbung

Um zwischen lebenden und toten Zellen in Bakterienkulturen der spätstationären Phase zu differenzieren, wurden diese mit zwei spezifischen Nukleinsäure-Farbstoffen (Live/dead BacLight bacteria viability assay, MOBITEC, Göttingen) angefärbt. Die Differenzierung zwischen lebenden und toten Zellen erfolgt über die defekte Zellembra. Während ein Farbstoff alle Bakterienzellen grün-fluoreszent anfärbt, lassen sich mit dem zweiten rot-fluoreszenten Farbstoff nur Zellen, deren Membran geschädigt ist, anfärben. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Wurden Zellaggregate gefärbt, so wurden diese nach dem Absinken nicht abzentrifugiert, sondern durch Absinken sedimentiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden mit einem Zeiss Axioplan 2 Mikroskop (Zeiss, Jena) mit Anregungsfilter BP450-490, dichromatischem Strahlenteiler 510 und Sperrfilter LP520 durchgeführt und die Bilder mit einer 3-Chip-RGB-Farbvideokamera (Hamamatsu Photonic Systems, Bridgewater, N.J., USA) aufgenommen.

3.14 Präparation von Proben für Elektronenmikroskopische Analysen

Proben zur elektronenmikroskopischen Analyse wurden in LR-white-Harz (Plano, Wetzlar) nach Hurek und Villiger (1992) eingebettet. Das Schneiden am Ultramikrotom OM U3 (Reichert, Wien) erfolgte nach Hurek *et al.* (1994a), und die elektronenmikroskopischen Arbeiten wurden am Transmissions-Elektronenmikroskop Philips EM 301 durchgeführt.

3.15 Messungen der Enzymaktivität der β -Glucuronidase

Die Messung der enzymatischen Aktivität der β -Glucuronidase (Jefferson *et al.*, 1986) erfolgte durch die Zugabe eines künstlichen Substrats. Die β -Glucuronidase spaltet, ähnlich der β -Galactosidase, β -glycosidische Bindungen. Durch diese Spaltung wird in den künstlichen Substraten ein Farbstoff freigesetzt, welcher histochemisch oder kolorimetrisch nachgewiesen werden kann. In der quantitativen Messung wurde p-Nitrophenyl- β -D-glucuronid (pNPGlu) als Substrat zugegeben. Durch die Spaltung wurde ein gelber Farbstoff freigesetzt, dessen Konzentration bei einer Wellenlänge von 420 nm gemessen werden konnte. 500 µl einer exponentiell wachsenden Kultur (OD_{600} 0,3-0,8) wurden abzentrifugiert (1min, 15000xg) und in 1 ml GusA-Puffer aufgenommen. Die Hälfte dieser Suspension wurde zur Bestimmung der OD_{600} abgenommen. Die verbleibenden 500 µl Zellsuspension wurden durch Zugabe von 25 µl TE und 25 µl 0,1 % SDS sowie 10 s

Untersuchungen zur Funktion und Verbreitung

Durchmischen auf dem Vortexmischer perforiert. Die Zellen wurden für 10 min bei 37°C vorinkubiert. Dann erfolgte die Zugabe des Substrates (100 µl einer Stammlösung von 4mg/ml p-NPGlu in H₂O). Die exakte Zeit von der Zugabe des Substrates bis zur ersten sichtbaren Gelbfärbung der Lösung wurde gemessen und die Reaktion durch Zugabe von 200 µl Stop-Puffer (2,5 M 2-Amino-2-methyl-propandiol) beendet. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (2 min, 15000xg) sedimentiert und der Überstand gegen Puffer bei 420 nm gemessen. Die Aktivität der β -Glucuronidase in Miller Units wurde folgendermaßen berechnet:

$$(E_{420} \times 1000) : (t_{\min} \times OD_{600}) = \text{Miller units (U)}$$

GusA-Puffer:

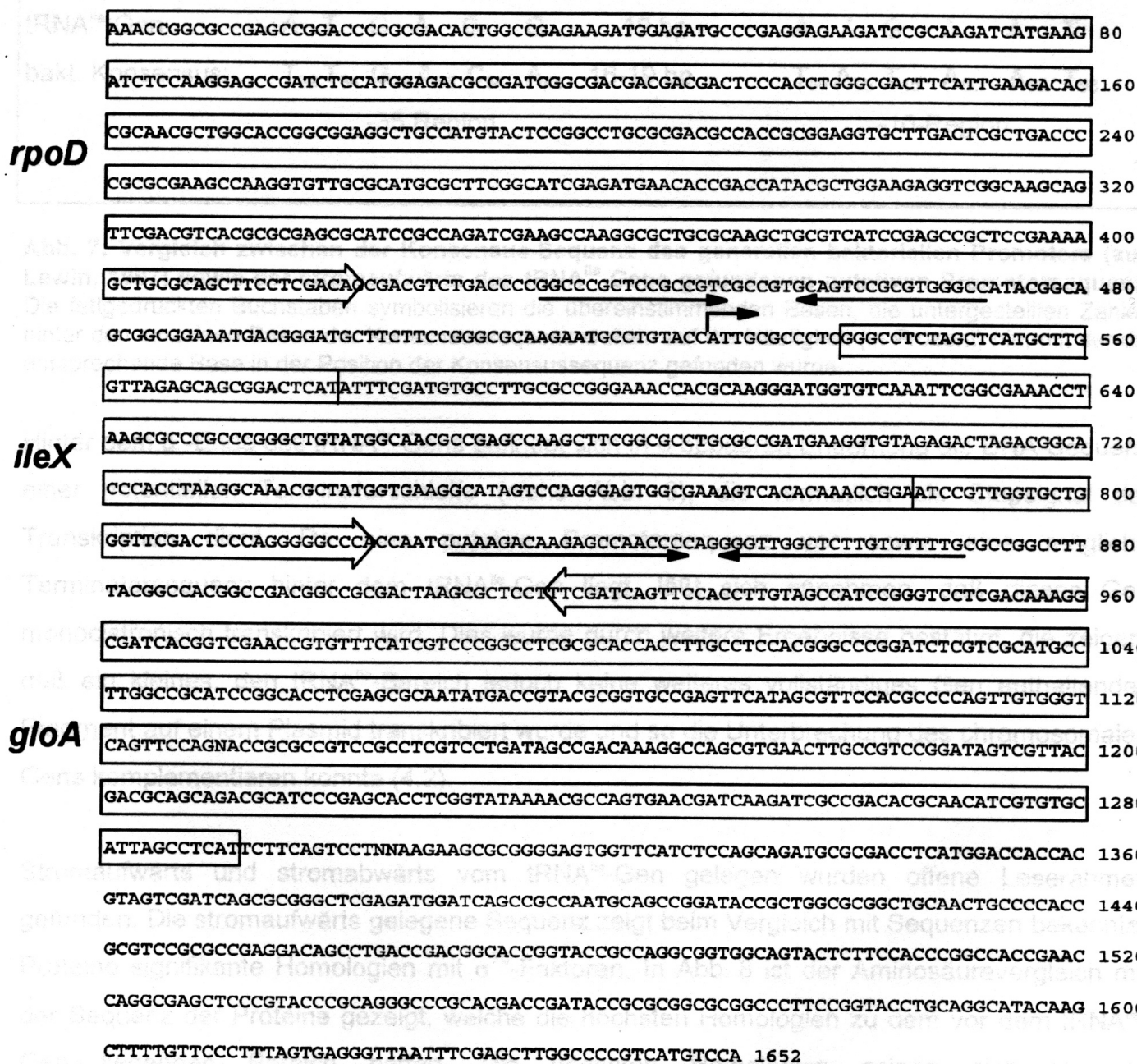
60 mM Na₂HPO₄ x 7 H₂O, 40 mM NaH₂PO₄ x 2 H₂O, 14 mM β -Mercaptoethanol, 1 mM Na₂-EDTA

4 ERGEBNISSE

4.1 Aufbau des tRNA^{Ile}-Gens sowie des umgebenden Genbereiches

Das zu untersuchende tRNA

Ile-Gen *ileX* (Abb. 6) ist 76 bp lang und enthält ein selbstspleißendes Intron der Gruppe I (Reinhold und Shub, 1992). Das 205 bp lange Intron ist hinter dem dritten Anticodon-Nukleotid der tRNA^{Ile} inseriert.



Untersuchungen zur Funktion und Verbreitung

Abb.6: Sequenzierter und charakterisierter das *ileX*-Gen umgebender Genbereich mit den offenen Leserahmen für *rpoD*, *ileX* und *gloA*.

Der Transkriptionsstart des tRNA^{Ile}-Gens *ileX* ist durch einen Pfeil gekennzeichnet und die Intronsequenz mit Strichen gegen das übrige *ileX*-Gen abgegrenzt. Das Motiv für einen möglichen Terminatorstamm hinter *rpoD* bzw. *ileX* ist durch entgegengesetzte Pfeile markiert. *rpoD*, Gen des Sigma Faktors (σ^{70}); *ileX*, Gen für die tRNA^{Ile}_{minor}; *gloA*, Gen der Glyoxalase (B. Reinhold-Hurek, unveröffentlichte Sequenzdaten).

20 bp stromaufwärts vom tRNA

Ile-Gen gelegen, wurde die putative Sequenz eines klassischen bakteriellen Promoters gefunden. Die Erkennung dieses Promotortyps durch die RNA-Polymerase wird von dem generellen Sigmafaktor (σ^{70}) vermittelt. Die gefundene Sequenz zeigt, wie in Abb. 7 dargestellt ist, hohe Homologien mit der Konsensus-Sequenz, die für diese generellen bakteriellen Promotoren bekannt sind (Lewin, 1997). Der Anfang des Gens befindet sich 20 bp stromabwärts von der -10-Region.

tRNA

Ile-Gen: **A T G A C G** -19 bp - **A A G A A T**

bakt. Konsensus: T₈₂ T₈₄ G₇₈ A₆₅ C₅₄ A₄₅ -16-19 bp - T₈₀ A₉₅ T₄₅ A₆₀ A₅₀ T₉₆

-35 Region

-10-Region

Abb. 7: Vergleich zwischen der Konsensus-Sequenz des generellen bakteriellen Promotors (aus Lewin, 1997) sowie der stromaufwärts des tRNA^{Ile}-Gens gefundenen putativen Promotorsequenz.

Die fettgedruckten Buchstaben symbolisieren die übereinstimmenden Basen, die untergestellten Zahlen hinter den einzelnen Basen der Konsensussequenz weisen auf die Häufigkeit (in Prozent) hin, mit der die entsprechende Base in der Position der Konsensussequenz gefunden wurde.

Hinter dem 3'-Ende des tRNA

Ile-Gens befindet sich in 6 bpaaren Entfernung die DNA-Sequenz einer potentiellen Terminatorschleife (siehe Abb. 6), die vermutlich als Stoppsignal der Transkription dient. Da eine putative Promotorsequenz vor sowie eine mögliche Terminatorsequenz hinter dem tRNA^{Ile}-Gen liegt, läßt sich annehmen, daß dieses Gen monocistronisch transkribiert wird. Dies wurde durch weitere Ergebnisse bestätigt, die zeigen, daß ein kleines, den tRNA^{Ile}-Bereich jedoch keine weiteres vollständiges Gen enthaltendes Fragment auf einem Plasmid transkribiert wurde und so die Unterbrechung des chromosomalen Gens komplementieren konnte (4.2).

Stromaufwärts und stromabwärts vom tRNA

Ile-Gen gelegen wurden offene Leserahmen gefunden. Die stromaufwärts gelegene Sequenz zeigt beim Vergleich mit Sequenzen bekannter Proteine signifikante Homologien mit σ^{70} -Faktoren. In Abb. 8 ist der Aminosäurevergleich mit der Sequenz der Proteine gezeigt, welche die höchsten Homologien zu dem vor dem tRNA^{Ile}-Gen liegenden Bereich hatten. Die höchsten Homologien zeigen sich zu der Aminosäuresequenz der σ^{70} -Untereinheit der RNA-Polymerase von *Bordetella pertussis* (Steffen *et al.*, 1997) mit 82,5% Aminosäure-Identität. Danach folgen die Sequenzen von *Neisseria gonorrhoeae* mit 80,4% sowie *Xanthomonas campestris* mit 74,1% Aminosäuren-Identität. Die angegebenen Homologien beziehen sich dabei jeweils auf die abgeleiteten Aminosäuren des sequenzierten Teilbereichs von *Azoarcus* sp. BH72.

Untersuchungen zur Funktion und Verbreitung

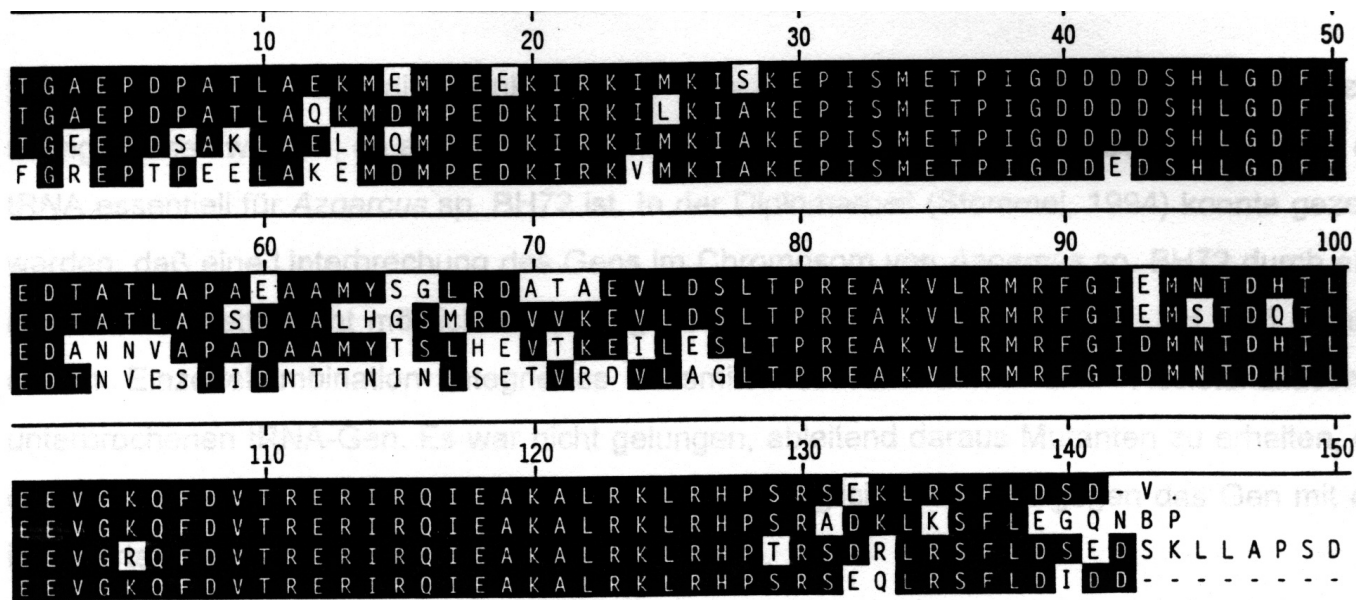


Abb.8: Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz des sequenzierten Teilbereiches von (1) *Azoarcus* sp. BH72, (2) *Bordetella pertussis* (U73858), (3) *Neisseria gonorrhoeae* (L42289) und (4) *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (U82763).

Als Quelle diente die nicht redundante Protein-Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) mit Hilfe des BLAST-Programmes (Altschul *et al.*, 1990) des BLAST Network Service. Für den Vergleich wurden Sequenzen aus der EMBL-Datenbank herangezogen. Die Datenbankeingangsnummern sind jeweils in Klammern gesetzt. In zwei oder mehr Proteinsequenzen identische Aminosäuren sind schwarz unterlegt. Lücken in den Sequenzen (-) wurden von dem verwendeten Programm Clustal-Pairwise-Alignment (Higgins *et al.*, 1989) in DNASTAR Inc., (Lasergene, Madison), falls nötig eingefügt, um eine optimale Übereinstimmung der verglichenen Sequenzen zu erhalten.

Stromabwärts vom potentiellen σ^{70} -Faktor-Gens gelegen, befindet sich in 14 bp Entfernung die DNA-Sequenz einer potentiellen Terminatorschleife (siehe Abb. 6), die vermutlich als Stoppsignal der Transkription dient. Dies ist ein weiterer Hinweis auf eine monocistronische Transkription des tRNA

Ile -Gens.

Im stromabwärts gelegenen Bereich des tRNA

Ile -Gens wurde ein 408 bp großes, in zu *ileX* in entgegengesetzter Richtung abgelesenes Leseraster gefunden (Abb. 6). Die abgeleitete Aminosäuresequenz zeigt die höchste Homologie zu dem Gen *gloA* aus *Salmonella typhimurium* (Clugston *et al.*, 1997). Das Genprodukt Glyoxalase vermittelt eine Resistenz gegen die Verbindung Methylglyoxal.

Die Organisation des stromabwärts liegenden Bereiches unterstützt die Annahme, daß die Transkription von *ileX* hinter dem Gen abbricht, es also monocistronisch abgelesen wird und nicht in einem Operon organisiert ist.

4.2 Unterbrechung des *ileX*-Gens im Genom von *Azoarcus* sp. BH72 durch Komplementation mit einem plasmidkodierten tRNA^{Ile}-Gen

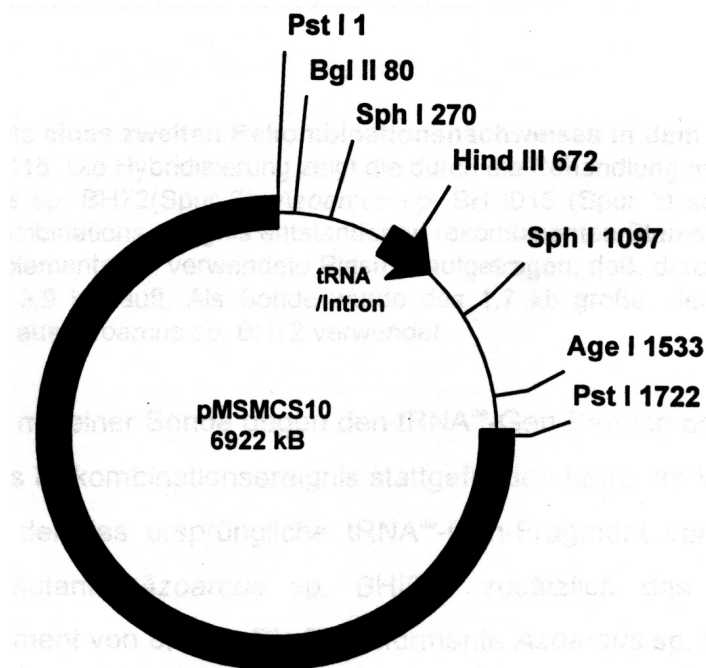
Um Rückschlüsse auf die Funktion des inserierten Introns zu erhalten, sollte zuerst nachgewiesen werden, ob es sich bei dem tRNA-Gen um ein funktionelles Gen handelt und die tRNA essentiell für *Azoarcus* sp. BH72 ist. In der Diplomarbeit (Stommel, 1994) konnte gezeigt werden, daß eine Unterbrechung des Gens im Chromosom von *Azoarcus* sp. BH72 durch eine Resistenzkassette nicht möglich war. Die genomische Mutante *Azoarcus* sp. BH I015 enthielt ein in Einzelrekombination integriertes Plasmid mit dem durch eine Resistenzkassette unterbrochenen tRNA-Gen. Es war nicht gelungen, ableitend daraus Mutanten zu erhalten, die durch ein zweites Rekombinationsereignis das ursprüngliche *ileX*-Gen gegen das Gen mit der integrierten Resistenzkassette ausgetauscht hatten.

Um zu belegen, daß dieses zweite Rekombinationsereignis prinzipiell möglich, aber der Austausch lethal für die Zelle ist, wurde ein Plasmidkonstrukt zur Komplementation entworfen. Ein plasmidkodiertes tRNA-Gen sollte der Zelle die notwendige Genkopie zur Verfügung stellen. Damit sollte ein zweites chromosomales Rekombinationsereignis und somit der Austausch des Wildtyp-tRNA

^{Ile}-Gens gegen das mutierte Gen möglich gemacht werden. Zur Herstellung des Plasmidkonstrukts pMSMCS10 (Abb. 9) wurde das tRNA^{Ile}-Genfragment, einschließlich des putativen Promotorbereiches, in die *Pst* I-Schnittstelle des Vektor pBBRMCS3 (Kovach *et al.*, 1995) kloniert. Dieser Vektor vermittelt eine Tetracyclinresistenz. Die Plasmide der pBBRMCS-Gruppe sind in *Azoarcus* sp. BH72 bei Antibiotikazugabe stabil (B. Reinhold-Hurek, persönliche Mitteilung).

Abb. 9: Restriktionskarte des Plasmids pMSMCS10.

Das Konstrukt entstand aus dem Plasmid pBGB10 aus dem ein 1,7 kb großes *Pst* I-Fragment in die *Pst* I-Schnittstelle von pBBRMCS III eingesetzt wurde.



Dieses 6,9 kb große Plasmid pMSMCS10 wurde in die genomische Mutante *Azoarcus* sp. BHI015 elektroporiert. Die erhaltenen tetrazyklinresistenten Transformanten wurden für das folgende Replika-Plattieren so verdünnt, daß in diesem Versuch insgesamt ca. 9000 Kolonien betrachtet werden konnten. Diese Kolonien wurden nach dem Replika-Verfahren auf VM-Ethanol-Nährböden mit Tetrazyklin, Streptomycin und Spectinomycin und danach wieder auf VM-Ethanol-Nährböden mit Tetrazyklin überstempelt. Von den 9000 transformierten Kolonien schienen nach dem Replika-Plattieren 43 Kolonien zwar noch fähig, auf Streptomycin und Spectinomycin, aber nicht mehr auf Ampicillin zu wachsen, d.h. sie enthielten zwar noch die Resistenzkassette, aber nicht mehr den die Ampicillin-Resistenz vermittelnden

pUC19-Vektor. Bei diesen Klonen müßte in einem zweiten Rekombinationsereignis das Wildtyp- tRNA

^{Ile}-Gen gegen das die Resistenzkassette enthaltende tRNA^{Ile}-Gen ausgetauscht worden sein. Das Wildtypgen und der die Ampicillinresistenz vermittelnde pUC19-Vektor gingen dabei verloren (Abb. 10).

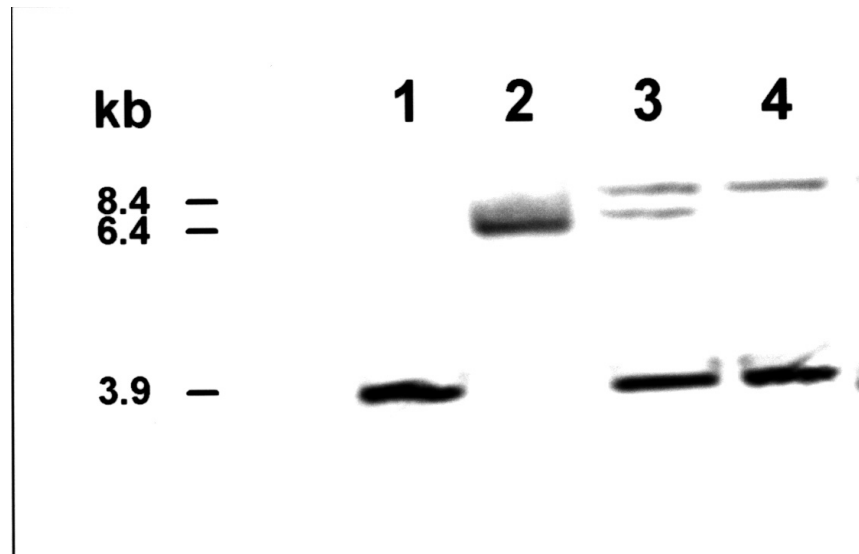


Abb. 10: Hybridisierung zum Nachweis eines zweiten Rekombinationsnachweises in dem plasmid-komplementierten *Azoarcus* sp. BH I015.

Die Hybridisierung zeigt die durch die Behandlung mit *Bam*H I entstandenen Fragmente von *Azoarcus* sp. BH72 (Spur 2), *Azoarcus* sp. BH I015 (Spur 3) sowie dem durch ein zweites chromosomales Rekombinations-ereignis entstandenen rekombinanten Stamm BHIDR7 (Spur 4). In Spur 1 wurde das zur Komplementation verwendete Plasmid aufgetragen, daß, durch *Bam*H I nicht geschnitten wird und so bei ca. 3,9 kb läuft. Als Sonde wurde das 1,7 kb große, den tRNA^{Ile}-Genbereich enthaltende Pst I-Fragment aus *Azoarcus* sp. BH72 verwendet.

Die Southernblot-Analyse (Abb. 10) mit einer Sonde gegen den tRNA

^{Ile}-Gen-Bereich bestätigte, daß ein Austausch durch ein zweites Rekombinationsereignis stattgefunden hatte. Im Vergleich zum Wildtyp *Azoarcus* sp. BH72, der das ursprüngliche tRNA^{Ile}-Gen-Fragment von 6,4 kb zeigte, besaß die genomische Mutante *Azoarcus* sp. BHI015 zusätzlich das um die Resistenzkassette vergrößerte Fragment von 8,4 kb. Die Transformante *Azoarcus* sp. BHIDR7, die noch auf Streptomycin und Spectinomycin, aber nicht mehr auf Ampicillin wachsen konnte, besaß nur noch das größere, die Resistenzkassette enthaltende Fragment. Eine Unterbrechung des tRNA^{Ile}-Gen im Genom ist also möglich. Jedoch muß das Gen in der Zelle, ob im Genom oder plasmidkodiert, vorliegen. Damit ist das tRNA^{Ile}-Gen für *Azoarcus* sp. BH72 offenbar essentiell.

4.3 Deletion des Introns im tRNA

^{Ile}-Gen von *Azoarcus* sp. BH72

Um Aufschluss über eine mögliche Funktion des Introns in *Azoarcus* sp. BH72 zu erlangen, sollte versucht werden, es aus dem Genom des Stammes exakt zu deletieren. Dazu wurde ein in der Diplomarbeit hergestelltes Plasmidkonstrukt verwendet. Durch ein einfaches homologes Rekombinationsereignis sollte zunächst das gesamte Plasmid integrieren, so daß auf die Ampicillin-Resistenz des Vektors selektiert werden

Untersuchungen zur Funktion und Verbreitung

konnte. Die so gewonnenen *Azoarcus*-Mutanten sollten einer Durchmusterung auf ein zweites Rekombinationsereignis hin unterworfen werden, durch die das Wildtypgen mit 50%iger Wahrscheinlichkeit gegen das mutierte Gen ausgetauscht werden sollte.

4.3.1 Transformation in *Azoarcus*-sp. BH72 und erste Durchmusterung der Transformanten

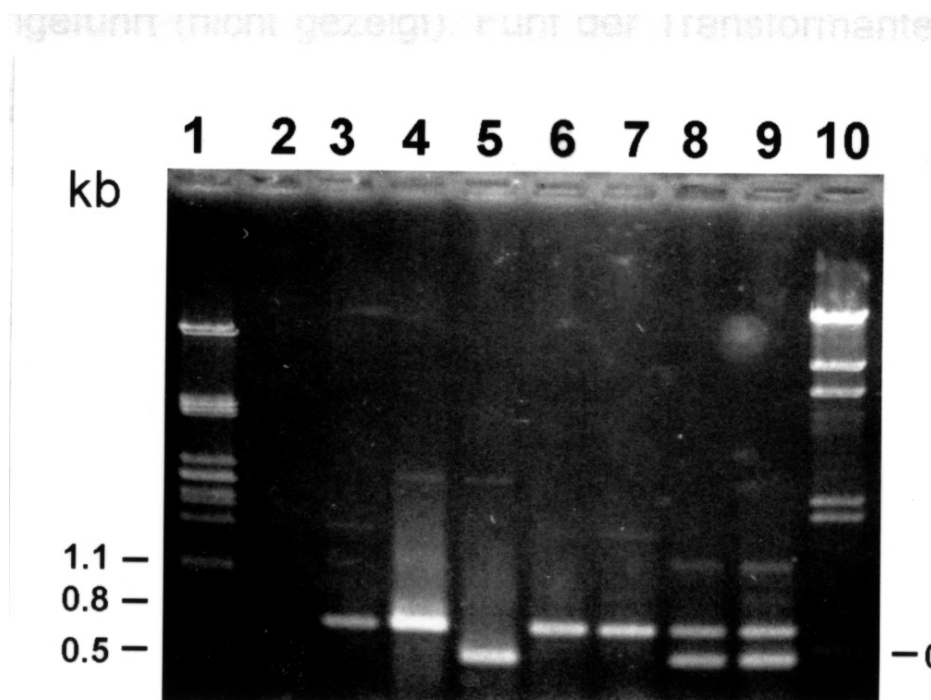
Als Ausgangskonstrukt lag das schon in der Diplomarbeit klonierte Plasmid pBGB24d vor (Stommel, 1994). Es enthält ein, den *ileX*-Genbereich umfassendes, 4,1kb langes Fragment. Die Intronsequenz war mittels PCR durch Primer, die die mutierte Sequenz trugen, so deletiert worden, daß ein ununterbrochenes tRNA-Gen entstanden war. Schon in der Diplomarbeit (Stommel, 1994) war versucht worden, dieses Konstrukt in den Stamm BH72 zu transformieren. Erst durch Einsetzen niedrigerer Ampicillin-Konzentrationen bei der Anzucht der transformierten Zellen gelang es im Verlauf dieser Arbeit, das Konstrukt erfolgreich in *Azoarcus* sp. BH72 zu transformieren.

Um einen schnellen und einfachen Nachweis genomischer Mutanten zu erstellen, der eine aufwendige Southern Hybridisierung umgeht, wurde ein Testsystem, das auf der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beruht entwickelt (Stommel, 1994). Das Testsystem beruht auf einer PCR-Reaktion mit den Primern BR54 und MS1, die zueinanderlaufend ein 760 bp großes DNA-Fragment der genomischen DNA im tRNA

lle-Genbereich amplifizieren. Ist in der zu amplifizierenden Sequenz das Intron deletiert, wie in dem in die Transformation eingesetzten Konstrukt pBGB24d, so ist das amplifizierte Fragment um die fehlende Intronsequenz von 205 Nukleotiden kleiner. Aus den transformierten Einzelrekombinanten sollten beide Fragmente amplifizierbar sein, da sie sowohl das intakte Wildtypgen als auch das Deletionskonstrukt im Genom tragen. Mit diesem Nachweis konnte zwischen *Azoarcus* sp. BH72-Zellen, die das Wildtyp-Gen, das mutierte Gen oder beide Kopien enthielten, unterschieden werden. Die genomische DNA von vier ampicillinresistenten Transformanten wurde in eine PCR-Reaktion mit den oben erwähnten Primern eingesetzt. Abb. 11 zeigt die elektrophoretisch aufgetrennten PCR-Produkte.

Abb.11: Elektrophoretische Auftrennung von PCR-Produkten zum Nachweis von Einzelrekombinanten.

Die Banden zeigen das durch die Primer BR54 und MS1 amplifizierte Fragment von *Azoarcus* sp. BH72 (Spur3), den Plasmiden pBGB10 (Spur 4) und pBGB10d (Spur 5) sowie den Transformanten 1,2,3 und 4 (Spuren 6-9). Spur 2 zeigt die PCR-Kontrollbande ohne DNA. Als Größenstandard wurde mit *Pst* I (Spur 1) bzw. mit *Hind* III (Spur 10) behandelte λ -DNA aufgetragen.



Die Transformanten 1 und 2 zeigten in der elektrophoretischen Auftrennung der amplifizierten DNA nur das

Untersuchungen zur Funktion und Verbreitung

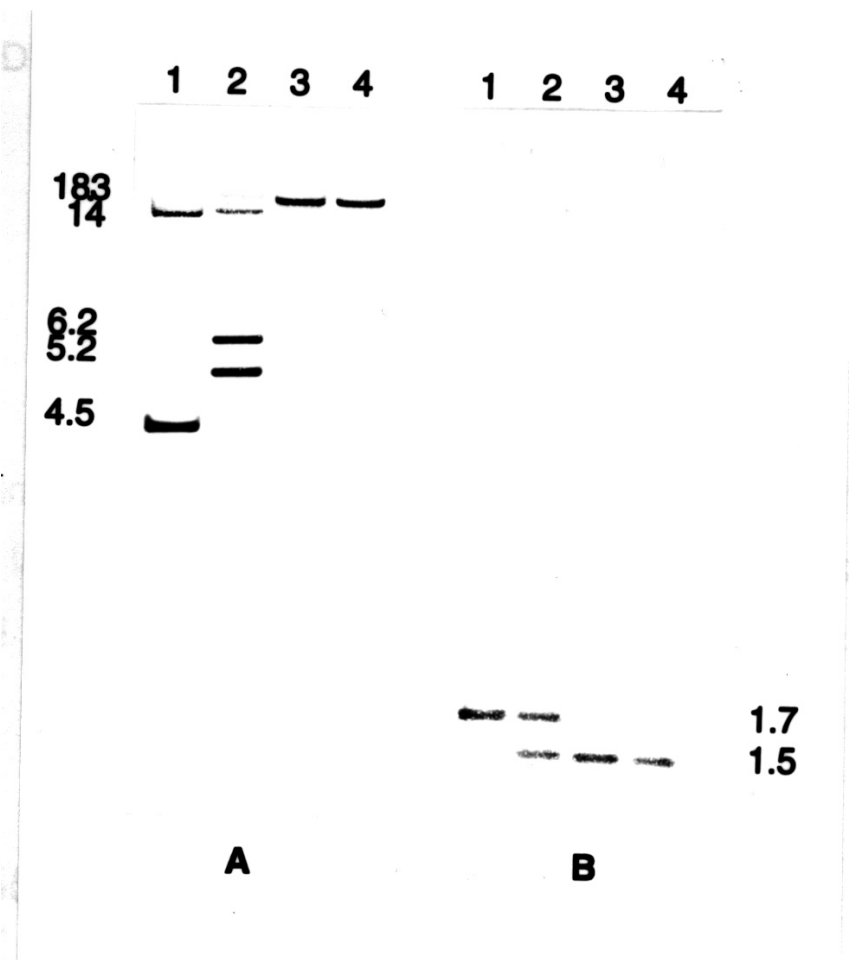
obere Fragment, es handelte sich sehr wahrscheinlich um Klone, die eine Spontanresistenz gegen das Antibiotikum Ampicillin entwickelt haben. Transformanten 3 und 4 zeigten beide Fragmente, es hatte also eine Rekombination des Konstrukts ins Genom stattgefunden. Der in Spur 7 aufgetragene Klon BHSRD4 wurde für ein zweites Rekombinationsereignis eingesetzt.

4.3.2 Austausch des tRNA^{Ile}-Gen im Genom

Im weiterfolgenden Experiment sollte nun versucht werden, durch ein weiteres Rekombinationsereignis eine Kopie des Gens sowie das restliche Plasmid zu entfernen. Dabei sollte mit gleichhoher Wahrscheinlichkeit entweder das Wildtyp-Gen oder das mutierte Gen im Genom verlorengehen. Um trotz der geringen Wahrscheinlichkeit des Rekombinationsereignisses mehrere Rekombinanten zu erhalten, mußte eine genügend große Anzahl von Zellen untersucht werden. Dazu wurde eine Kultur der Mutante *Azoarcus* sp. BHSRD4 für das folgende Replika-Platieren so verdünnt, daß insgesamt ca. 4000 Kolonien betrachtet werden konnten. Die ausplattierten Kolonien wurden nach dem Replika-Verfahren erst auf VM-Ethanol-Nährboden mit Ampicillin und danach wieder auf VM-Ethanol-Nährböden überstempelt. Von den 4000 transformierten Kolonien schienen 35 nicht mehr in der Lage, auf Ampicillin zu wachsen, d.h. sie enthielten das Resistenzgen nicht mehr. Von diesen Mutanten sollten statistisch gesehen 50% das ursprüngliche Gen gegen das introndeletierte *ileX*-Gen ausgetauscht haben. Von 20 ausgewählten Transformanten-Kolonien wurden eine wie oben beschriebene PCR-Reaktion durchgeführt (nicht gezeigt). Fünf der Transformanten zeigen nur das kleinere, intronlose PCR-Fragment, davon wurden zwei ausgewählte Transformanten in der Southern Hybridisierung überprüft (Abb. 12).

Abb. 12: Hybridisierung zum Nachweis von durch Doppelrekombination erhaltenen, intronlosen Mutanten.

Die Southern-Hybridisierung zeigt das entstandene Restriktionsmuster der mit *Hind* III (A) bzw. mit *Pst* I (B) geschnittenen, genomischen DNA von *Azoarcus* sp. BH72 (Spur 1), der Einzelrekombinante BHSRD4 (Spur 2) sowie von zwei ampicillinsensitiven Doppelrekombinanten (Spur 3,4). Als Sonde wurde ein 0,726 kb großes, mit den Primern MS1 und BR54 in der PCR amplifiziertes Fragment verwendet, daß sich über den tRNA-Bereich von *Azoarcus* sp. BH72 erstreckt.



Die Restriktionsfragmente zeigen, daß in den beiden aufgetragenen Doppelrekombinanten ein Austausch des Wildtypgens gegen das introndeletierte Konstrukt stattgefunden hat. Während der Wildtyp, wie in der Behandlung mit dem Restriktionsenzym *Pst* I gut erkennbar, das obere Intron enthaltende Fragment aufwies,

zeigte die Einzelrekombinante beide Fragmente, da sie beide Varianten des *ileX*-Gens enthielt. Die Klone in Spur 3 und 4 zeigten nur die untere Bande. Wie der Behandlung mit *Hind* III zeigt, enthaltendie beiden intronlosen Klone (Spur 3 und 4) nur noch eine Bande, die im Gegensatz zum Wildtyp (Spur 1) größer wird, da die im Intron gelegene *Hind* III-Schnittstelle wegfällt. Dies zeigt, daß beide nur noch die introndeletierte Kopie des tRNA

^{Ile}-Gen besitzen. Die Deletion des Introns ist also für *Azoarcus* sp. BH72 nicht lethal.

4.4 Analyse des 5'-Ende des tRNA^{Ile}-Transkripts

Um den Transkriptionsstart des tRNA

^{Ile}-Gens zu bestimmen sowie zu untersuchen, ob verschiedene Prozessierungsformen am 5'-Ende des tRNA^{Ile}-Transkripts vorliegen, wurden verschiedene Primer extension-Reaktionen durchgeführt. Die putative Sequenz des Promotorbereiches war bekannt und liegt 20 bp stromaufwärts vom *ileX*-Gen gelegen (4.1). Die Erkennung dieses Promotortyps durch die RNA-Polymerase wird vermutlich von dem generellen Sigmafaktor (σ^{70}) vermittelt. Es wurde parallel Wildtyp-Transkript, sowie solches aus der intronlosen Mutante BHDRDI auf das 5'-Ende hin untersucht. So sollte ein eventuell durch die Introndeletion in der Mutante BHDRDI entstandener Unterschied zum Wildtyp-Transkript nachgewiesen werden.

4.4.1 Formulierung der Primer

Da die Reverse Transkriptase nur kürzere Transkripte effizient synthetisiert, sollte die Primersequenz optimalerweise nicht länger als ca. 100 bp vom prognostizierten Transkriptionsstart entfernt sein (Ausubel *et al.*, 1987). Es wurden zwei verschiedene Primer formuliert (Abb. 13).

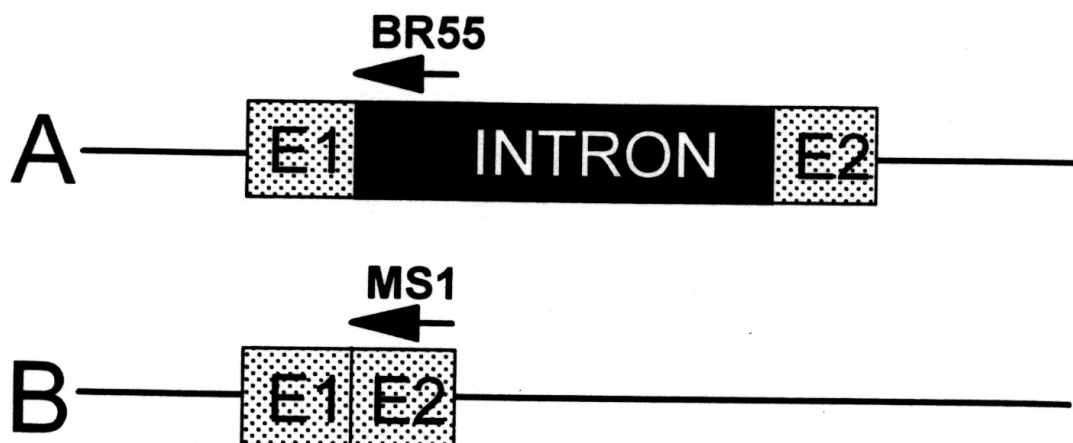


Abb. 13: Darstellung der beiden in die Primer extension-Reaktion eingesetzten Primer.

(A) Der Primer BR55 bindet im Intronbereich (B), während der zweite Primer MS1 im hinteren Bereich des tRNA^{Ile}-Transkripts bindet. E1, Exon 1; E2, Exon 2.

Der 29 Nukleotide lange Primer BR55 bindet im 5'-Bereich der Intronsequenz und erfaßt bei der Primer extension-Reaktion nur intronhaltiges Transkript. Der Primer MS1, der 25 Nukleotide lang ist, bindet in der hinter dem Intron liegenden tRNA-Sequenz, dem Exon 2. So werden nur Transkripte erfaßt, in denen das

Intron nicht enthalten ist, bzw. schon herausgespleißt wurde. Eine effiziente, vollständige reverse Transkription intronhaltiger RNA-Transkripte durch den Primer MS1 war wegen ihrer Länge nicht zu erwarten.

4.4.2 Primer extension-Reaktion mit verschiedenen RNA-Extrakten

Zur Primer extension wurden RNA-Extraktionen verschiedener *Azoarcus* sp. BH72-Kulturen eingesetzt. Verwendet wurde extrahierte RNA aus dem Wildtyp *Azoarcus* sp. BH72 unter aeroben und stickstofffixierenden Bedingungen sowie aus aerob gezogenen Zellen der Mutante. Zu der parallel laufenden Sequenzierung wurde jeweils der gleiche Primer eingesetzt. Abb. 14 zeigt die Signale der Primer extension aus verschiedenen Extrakten mit den beiden Primern MS1 und BR55.

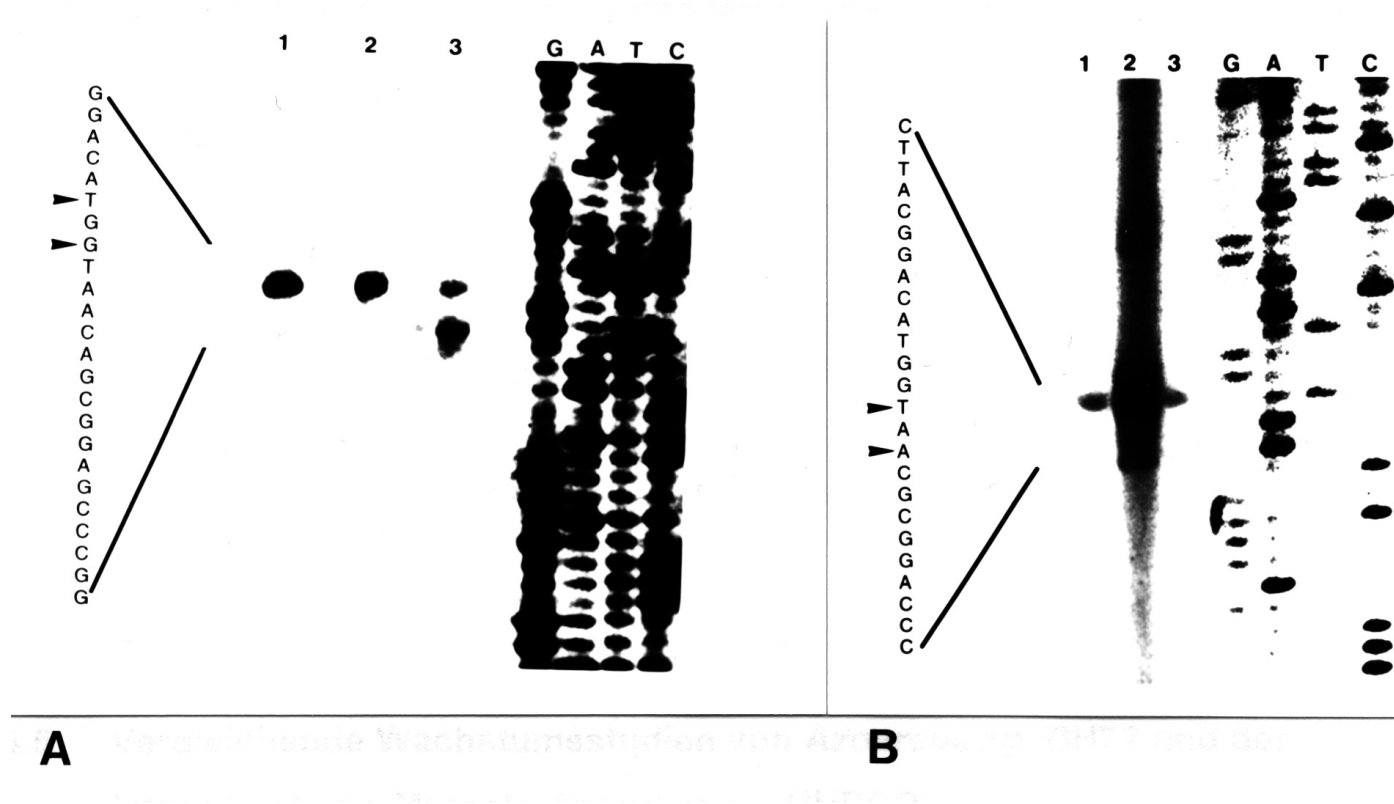


Abb. 14: Primer extension-Reaktionen mit den Primern BR55 (A) und MS1 (B).

Die Reaktionen wurden mit RNA aus aerob (A1, B1-3) und stickstofffixierend (A2) gewachsenen Zellen von *Azoarcus* sp. BH72 sowie RNA-Extrakt aus dem intronlosen Stamm BHDRDI (A3) durchgeführt. Für die Sequenzierungs-Reaktionen wurde der jeweils entsprechende Primer in der Primer extension-Reaktion verwendet.

Wie Abb. 15 zeigt, stimmt das mit dem Primer BR55 erhaltene Signal exakt mit dem durch die Promotorstruktur postulierten Start bei +1 überein (4.1)(Lewin, 1997). Alle RNA-Extrakte zeigen zwei Signale, ein starkes und ein, im Abstand von zwei Nukleotiden stromabwärts liegendes, schwächeres Signal. Die erhaltenen Signale sind bei den jeweils eingesetzten Primern unterschiedlich, d.h. die Primer extension-Reaktion mit BR55 zeigt ein im 5'-Bereich 3 Nukleotide kürzeres Signal als die mit dem Primer MS1 erhaltene Bande. Diese stromaufwärts liegende Verschiebung der durch den Primer MS1 erhaltenen

Untersuchungen zur Funktion und Verbreitung

Signale lassen sich durch ein abweichendes Laufverhalten der großen Mengen eingesetzter RNA während der Auftrennung erklären. Keines der erhaltenen Signale stimmt wie Abb. 15 darstellt, mit dem 5'-Ende der reifen tRNA überein. Es konnte also kein reifes, d.h. am 5'-Bereich durch die RNase P prozessiertes tRNA^{Ile}-Transkript in den Zellen nachgewiesen werden.

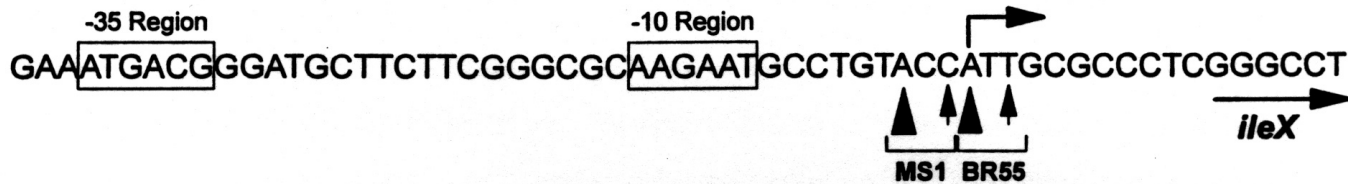


Abb. 15: Schematische Darstellung, der mit den Primern MS1 und BR55 detektierten 5'-Enden des *ileX*-Transkripts.

Die Pfeilköpfe geben die erhaltenen Signale in der stromaufwärts vom *ileX*-Gen liegenden Sequenz an. Der rechtwinklige Pfeil gibt den theoretisch wahrscheinlichen Transkriptionsstart an (Lewin, 1997) an. Die putativen Konsensussequenzen des Promotors sind eingerahmt und der in der Sequenz liegende Pfeil zeigt den durch die Promotorsequenz abgeleiteten Transkriptionsstart. Der unterlegte Pfeil markiert den Anfang des *ileX*-Gens.

Weiterhin gibt es keinen Unterschied im Signal und somit in der 5'-Prozessierung zwischen dem RNA-Transkript von Wildtyp *Azoarcus* sp. BH72 unter aeroben und stickstofffixierenden Bedingungen sowie Transkript aerob gezogener Zellen der Mutante BHDRDI. Die Deletion des Introns scheint somit keinen Einfluß auf die Prozessierung des 5'-Ende des tRNA^{Ile}-Transkriptes zu haben.

4.5 Vergleichende Wachstumsstudien von *Azoarcus* sp. BH72 und der Introndeletions-Mutante *Azoarcus* sp. BHDRDI

Die Deletion enzymatisch gespleißter Introns kann einen entscheidenden Einfluß auf die Reifung und Funktion der tRNA haben (Jiang, 1997; Johnson und Abelson, 1983). Um zu überprüfen, ob das selbstspleißende Intron in *Azoarcus* sp. BH72 eine ähnliche Funktion hat, sollte unter den verschiedenen Bedingungen das Wachstum der intronlosen Mutante BHDRDI im Vergleich zum Wildtyp *Azoarcus* sp. BH72 untersucht werden. Eine Deletion des Introns in *Azoarcus* sp. BH72 könnte die Reifung der tRNA beeinflussen und sich so auf das Wachstum unter aeroben, stickstofffixierenden oder auch hyperinduzierten Bedingungen auswirken. Zum Wachstumsvergleich der Kulturen wurden besondere Bedingungen gewählt. Zum einen wurde das exponentielle Wachstum jeweils über einen Zeitraum von mindestens 25 Generationen beobachtet. Durch diesen langen Beobachtungszeitraum sollten auch der Nachweis kleiner Unterschiede möglich gemacht werden. Dazu wurden sowohl der Wildtyp wie auch der introndeletierte Stamm im gleichen Kulturgefäß angezogen. Dies hatte den Vorteil, daß Wachstumsbedingungen wie Temperatur, Sauerstoffkonzentration, pH-Wert und Substratkonzentration für beide Stämme identisch waren und so einen besseren Vergleich des Wachstums ermöglichten.

4.5.1 Wachstumsvergleich unter aeroben Bedingungen in stickstoffhaltigem Medium

Um einen Einfluß der Introndeletion auf die maximale Wachstumsrate nachweisen zu können, wurden zunächst exponentiell wachsende Kulturen unter aeroben Bedingungen angesetzt. Als Wachstumsmedium wurde VM-Medium mit Ethanol als Kohlenstoffquelle und Ammoniumchlorid und Hefeextrakt als Stickstoffquellen verwendet (3.2.2), das mit beiden Stämmen in etwa gleicher Konzentration angeimpft

Untersuchungen zur Funktion und Verbreitung

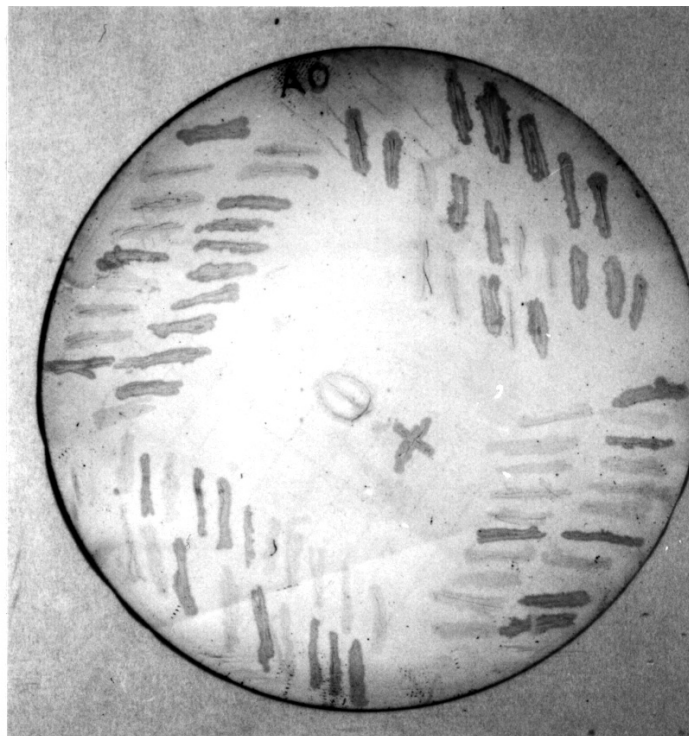
wurde. Die Kulturen wurden jeweils kurz vor Übergang in die stationäre Phase in frisches Medium überimpft. So war es möglich, die Bakterien über eine Dauer von 30 Generationen exponentiell wachsen zu lassen. Der Versuch wurde in drei Parallelen durchgeführt.

4.5.1.1 Identifizierung der Stämme mittels Koloniehybridisierung

Um zwischen den beiden im selben Kulturgefäß befindlichen Stämmen differenzieren zu können, wurde Koloniehybridisierung angewendet. Dazu wurden zu Beginn und während der Wachstumskurve Kulturproben entnommen und ausplattiert, die ausplattierten Kolonien auf Hybridisierungsfilter ausgestrichen und diese mit einer für den Wildtyp BH72 spezifischen Intron-Sonde hybridisiert. Die mit den Primern BR10 und MS2 synthetisierte DIG-markierte Sonde bindet ausschließlich im Intronbereich des tRNA^{lle}-Gens. So gibt, wie in Abb. 16 dargestellt, nur der Wildtyp BH72 in der Koloniehybridisierung ein Signal.

Abb. 16: Identifizierung der Stämme *Azoarcus* sp. BH72 bzw. B H D R D i d u r c h Koloniehybridisierung zum Zeitpunkt t_0 .

Auf den Hybridisierungsfilter wurden Kolonien einer ausplattierten Kulturprobe ausgestrichen. Bei der Koloniehybridisierung mit der Intronsonde zeigt nur der intronhaltige Wildtyp ein Farbsignal. Als Kontrollen wurden Wildtyp *Azoarcus* sp. BH72 (Plus-Zeichen) sowie die intronlose Mutante BHDRDI (Minus-Zeichen) ausgestrichen.



4.5.1.2 Durchsetzungsvermögen in Kokultur unter aeroben Bedingungen

Durch Auswertung der Koloniehybridisierung, die aus Kulturproben zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt wurde, konnte das Verhältnis der Zellen von *Azoarcus* sp. BH72 sowie der Mutante BHDRDI über einen Zeitraum von 30 Generationen nachgewiesen werden. Wie Abb. 17 zeigt, stieg der Anteil der Wildtyp-Zellen im Verlauf der Wachstumskurve von 56% auf 80% an. Der Anteil der Mutanten nahm dagegen um 24% von 44% auf 20% ab.

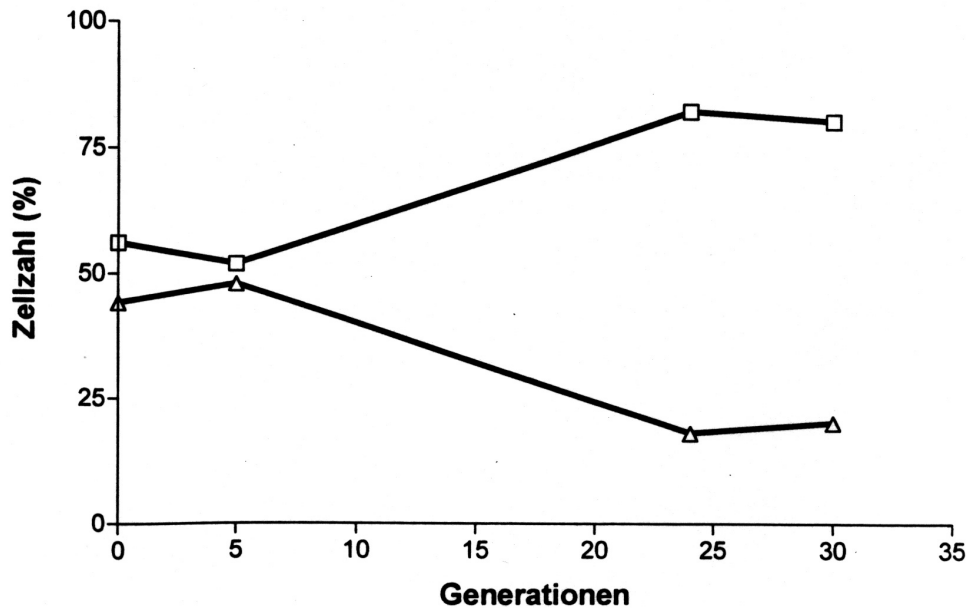


Abb. 17: Verschiebung des Verhältnisses zwischen *Azoarcus* sp. BH72 (□) und der Mutante BHDRDI (Δ) unter aeroben Wachstumsbedingungen in stickstoffhaltigem Medium.

Die intronlose Mutante wurde im Verhältnis zum intronhaltigen Wildtyp deutlich abgereichert. Berechnet man über den gesamten Verlauf des Wachstums die Wachstumsrate μ und die daraus resultierende Generationszeit, so zeigt der Wildtyp mit einer Generationszeit $t_D = 3,0$ einen Wert, der um 10 % niedriger liegt als die Generationszeit $t_D = 3,3$ der intronlosen Mutante BHDRDI. Dies läßt darauf schließen, daß die Deletion des Introns einen negativen Einfluß auf die maximale Wachstumsrate unter aeroben Wachstumsbedingungen in stickstoffhaltigem Medium hat.

4.5.2 Wachstumsvergleich unter stickstofffixierenden Bedingungen

Um einen möglichen Einfluß der Introndeletion auf die N_2 -Fixierung zu untersuchen, wurde das Wachstum von Mutante und Wildtyp unter mikroaeroben Bedingungen mit N_2 als Stickstoffquelle verglichen.

4.5.2.1 Anzucht im Fermenter

Um die Bakterienzellen unter mikroaeroben, stickstofffixierenden Bedingungen anzuziehen wurde ein Laborfermenter (Biostat B, Braun Biotech, Melsungen) verwendet. Diese Anzuchtform bot die Möglichkeit, die Sauerstoffkonzentration mikroaerob einzustellen und über die Dauer des Wachstumsversuches konstant zu halten. Weiterhin konnten so auch andere Wachstumsbedingungen, wie Temperatur, pH-Wert und Durchmischungsrate eingestellt, gemessen und geregelt werden. Der Fermenter wurde mit den beiden Stämmen in etwa der gleichen Animpfdichte beimpft. Die Kulturen wurden über den Verlauf der exponentiellen Wachstumsphase angezogen. Vor Beginn der stationären Phase wurde das Kulturvolumen so weit mit frischem Medium durchspült, bis eine OD von ungefähr 0,05 erreicht war. Diese optische Dichte entsprach der anfangs eingestellten Animpfmengung. Die Bakterien wurden erneut exponentiell angezogen, und Anzucht und Ausspülvorgang über einen Zeitraum von mindestens 25 Generationen wiederholt. Im Gegensatz zur kontinuierlichen Kultur unter substratlimitierenden Bedingungen war so ein Wachstum mit Substratüberschuß und maximaler Wachstumsrate möglich.

4.5.2.2 Durchsetzungsvermögen in Kokultur unter mikroaeroben, stickstofffixierenden Bedingungen

Die durch Auswertung der Koloniehybridisierung erhaltenen Verhältnisse der Zellen von *Azoarcus* sp. BH72 sowie der Mutante BHDRDI sind in Abb. 18 über einen Zeitraum von 30 Generationen dargestellt. Wie Abb. 18 zeigt, stieg der Anteil der Wildtyp-Zellen im Verlauf der Wachstumskurve von 33% auf 82% an. Der

Anteil der Mutanten-Zellen nahm dagegen um 39% ab.

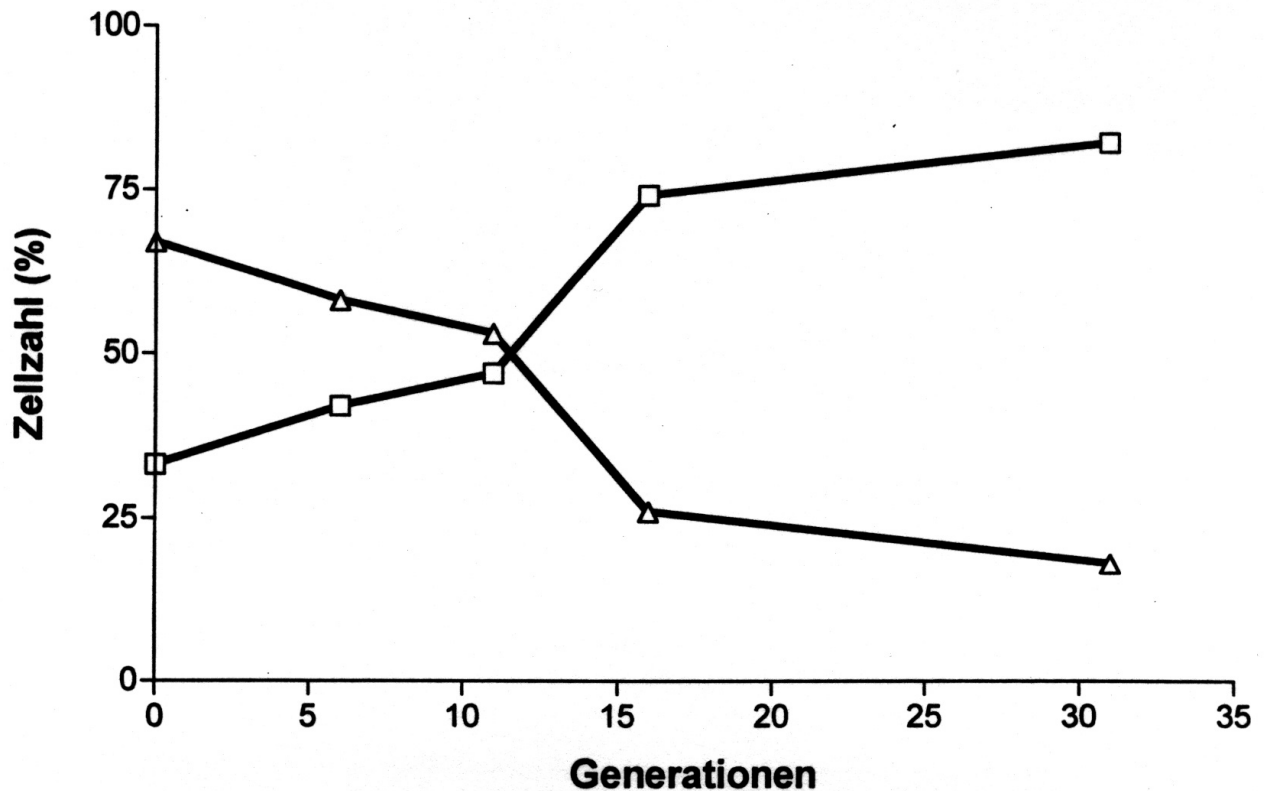


Abb. 18: Verschiebung des Verhältnisses zwischen *Azoarcus* sp. BH72 (□) und der Mutante BHDRDI (Δ) unter mikroaeroben Wachstumsbedingungen mit N₂ als Stickstoffquelle.

Auch unter mikroaeroben stickstofffixierenden Bedingungen wurde die intronlose Mutante BHDRDI gegenüber den intronhaltigen Wildtyp-Zellen deutlich abgereichert. Die Deletion des Introns scheint daher, einen negativen Einfluß auf das Wachstum auch unter mikroaeroben stickstofffixierenden Wachstumsbedingungen zu haben.

4.5.3 Wachstumsvergleich unter mikroaeroben Bedingungen in stickstoff- haltigem Medium

Da die intronlose Mutante BHDRDI unter stickstofffixierenden mikroaeroben Bedingungen einen signifikanten Wachstumsnachteil zeigte, wurde untersucht, ob sich der gleiche Verlauf unter mikroaeroben Bedingungen mit Stickstoffquelle zeigt. Dem Kulturmedium wurde die Stickstoffquelle Kaliumnitrat zugefügt (3.2.2). Die angezogenen Zellen waren also zum Wachstum nicht auf Stickstofffixierung angewiesen. So sollte differenziert werden, ob der im vorherigen Verlauf des Wachstums beobachtete Wachstumsnachteil der Mutante BHDRDI auf mikroaerobe Bedingungen oder Stickstofffixierung zurückzuführen war. Auch diese Kultur wurde im Laborfermenter angezogen. Die durch Auswertung der Koloniehybridisierungen erwarteten Verhältnisse der Zellen von *Azoarcus* sp. BH72 sowie der Mutante BHDRDI sind in Abb. 19 über einen Zeitraum von 25 Generationen dargestellt. Im Gegensatz zu den vorgestellten Wachstumsverläufen zeigte sich unter diesen Bedingungen ein Anstieg der intronlosen Zellen von BHDRDI um 20 %.

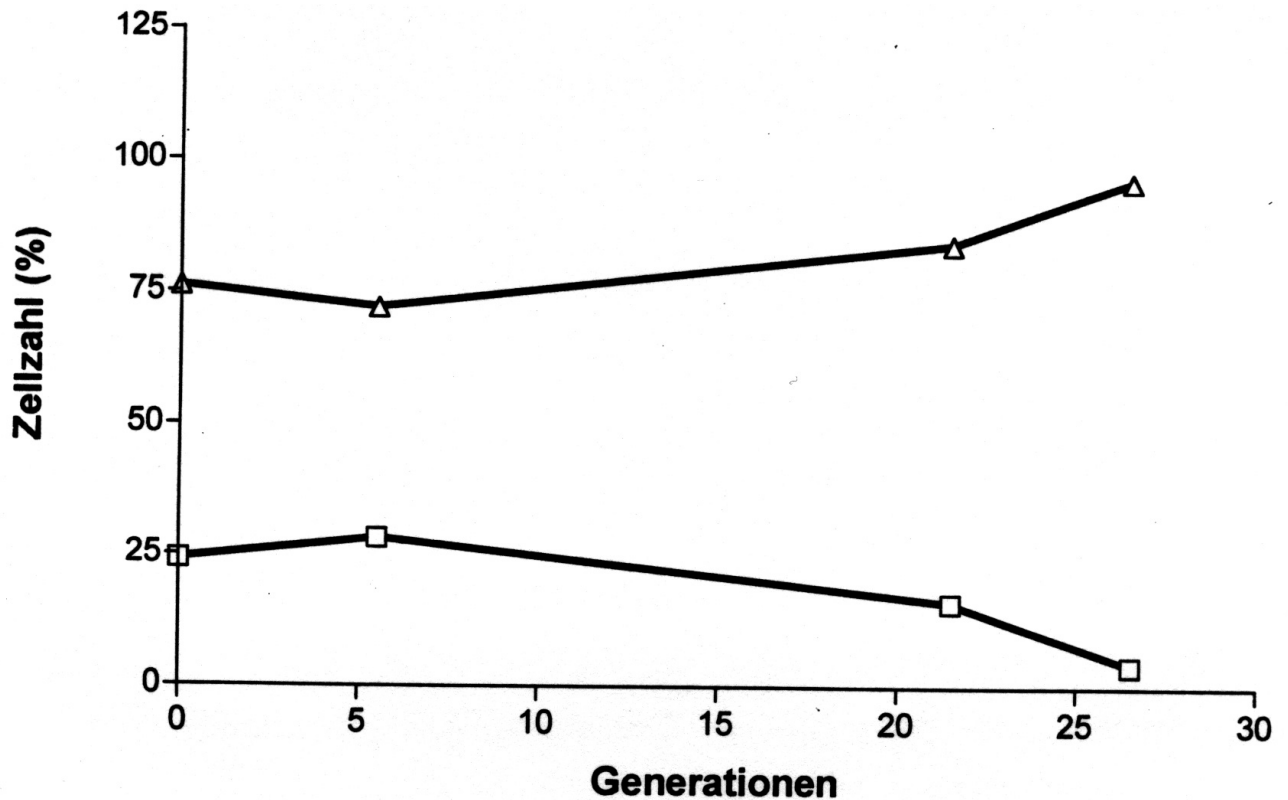


Abb. 19: Verschiebung des Verhältnisses zwischen *Azoarcus* sp. BH72 (□) sowie der Mutante BHDRDI (Δ) unter mikroaeroben Wachstumsbedingungen Kaliumnitrat mit Stickstoffquelle.

Die Konzentration der *Azoarcus* sp. BH72-Zellen nahm um den gleichen Betrag ab. Daraus läßt sich schließen, daß sich die Introndeletion nicht so stark auf das Wachstum unter mikroaeroben Bedingungen auswirkt, wenn Nitrat als Stickstoffquelle zugeführt wurde, d.h. die Zellen nicht zur Stickstofffixierung gezwungen sind. Dies scheint darauf hinzudeuten, daß die Beeinflussung des Wachstums durch die Introndeletion vom Stoffwechselweg abhängt.

4.6 Vergleich von *Azoarcus* sp. BH72 und der Mutante *Azoarcus* sp. BHDRDI in Dualkultur mit dem Ascomyceten *Acremonium alternatum* Stamm 2003

Der hyperinduzierte Zustand ist durch hohe spezifische Respirationsraten sowie eine gesteigerte Stickstofffixierungsrate mit erhöhter respiratorischer Effizienz gekennzeichnet (Hurek *et al.*, 1994b). In empirisch optimierter Dualkultur mit dem Ascomyceten *Acremonium alternatum* Stamm 2003 ist *Azoarcus* sp. BH72 fähig, über einen längeren Zeitraum den hyperinduzierten Zustand auszuprägen und effizient Stickstoff zu fixieren (Hurek *et al.*, 1995b). In Dualkulturen von *Azoarcus* sp. BH72 und der Mutante *Azoarcus* sp. BHDRDI wurden Stickstofffixierung sowie die Ausprägung des hyperinduzierten Zustands verglichen. Weiterhin wurde versucht, die Diazosomen, d.h. die Ausbildung der internen Membranstapel, zu quantifizieren. Dabei sollte untersucht werden, ob die intronlose Mutante sich physiologisch im Vergleich zum Wildtyp im hyperinduzierten Zustand sowie der Ausprägung der Diazosomen unterscheidet.

4.6.1 Anzucht von *Azoarcus* sp. BH72 und der Mutante *Azoarcus* sp. BHDRDI in Dualkultur

Das Ansetzen von *Azoarcus* sp. BH72 und der Mutante *Azoarcus* sp. BHDRDI in Dualkultur erfolgte in 12 Parallelen. Die Kulturansätze wurden mit Bakterien sowie dem Pilz beimpft (3.2.3.4) und die Gasphase auf eine Konzentration von 0,5% Acetylen in Raumluft eingestellt. Die eingestellte OD₅₇₈ betrug ca. 0,3; sowohl bei *Azoarcus* sp. BH72 als auch der Mutante *Azoarcus* sp. BHDRDI.

Untersuchungen zur Funktion und Verbreitung

Die Sauerstoff-Abnahme sowie Ethylenzunahme als Maßstab der Stickstofffixierung der Dualkulturen wurde über die gesamte Wachstumsdauer gaschromatographisch verfolgt (3.3). Die Dualkulturen wurden nach durchschnittlich 9 Tagen geerntet. Eine Bestimmung der OD_{578} war zu diesem Zeitpunkt nicht möglich, da die Bakterien eng an das Pilzmycel angeheftet sind. Die Bakterienzellen wurden abschließend für die Proteinextraktion aufgearbeitet (3.8).

4.6.2 Vergleich von Sauerstoffkonzentration und Stickstofffixierung im Verlauf der Dualkulturen

In Dualkultur konnte nach ein bis zwei Tagen Wachstum die Anheftung der Bakterienzellen an das Pilzmycel beobachtet werden. Der vorher trübe Überstand der Dualkultur wurde sichtlich klar (Abb.20). Die Adhäsion an das Pilzmycel wurde durch die Introndeletion offenbar nicht signifikant verändert.

Die Sauerstoffkonzentration nahm im Verlauf der Dualkultur durch das aktiv atmende Pilzmycel um ca. 2% pro Tag ab. Durch die damit verbundene Ausbildung mikroaerober Nischen sind die Bakterien vermutlich den stark herabgesetzten Gelöstsauerstoff-konzentrationen ausgesetzt. Zum Zeitpunkt der Ernte war der Sauerstoffpartialdruck im Gasraum auf 3-5% gesunken. Abb. 21 zeigt die Abnahme der Sauerstoffkonzentration und die Zunahme von Ethylen in der Gasphase von *Azoarcus* sp. BH72 und der Mutante *Azoarcus* sp. BHDRDI im Verlauf der

A		
---	--	--

B

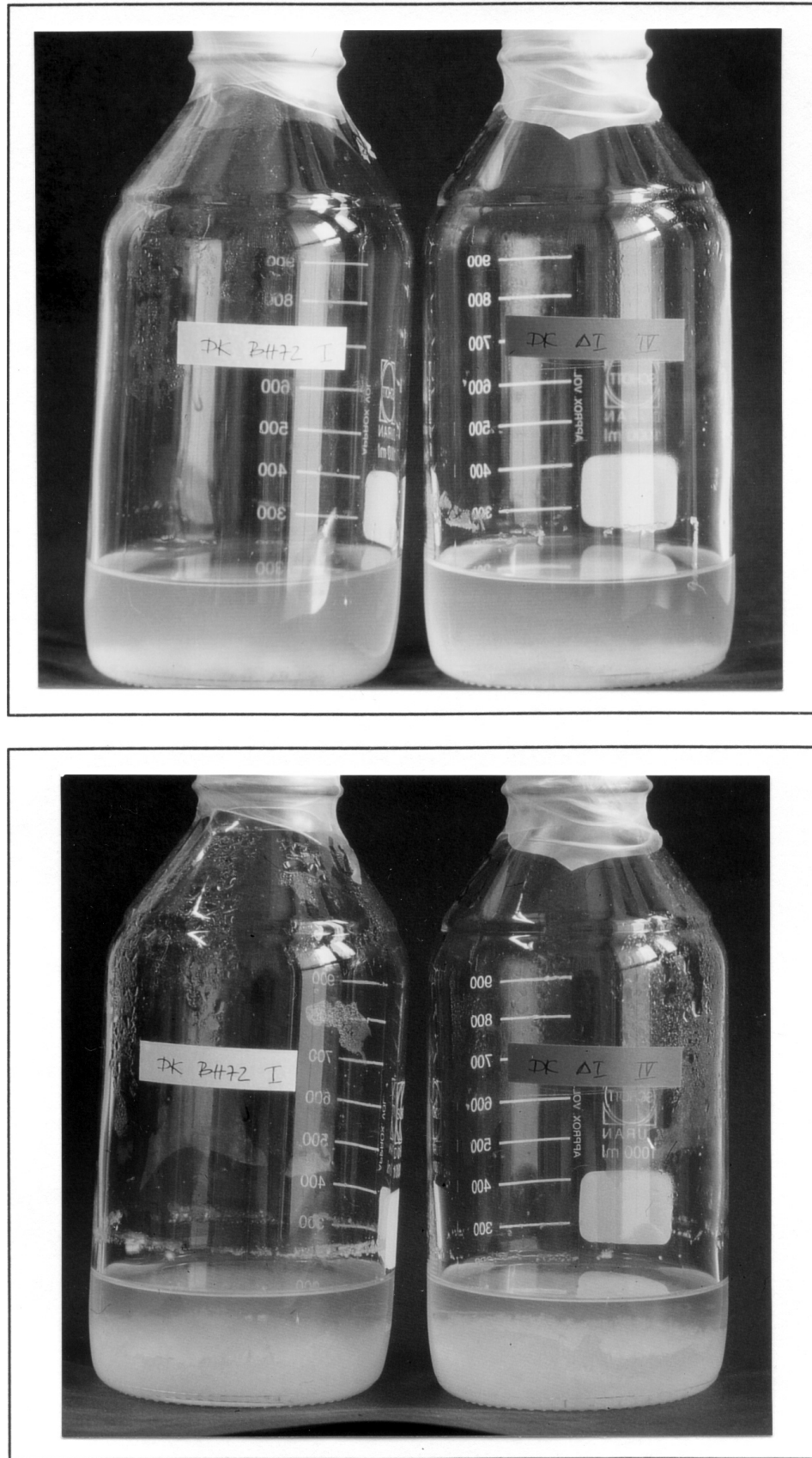


Abb. 20: Wachstum von *Azoarcus* sp. BH72 bzw. der Mutante *Azoarcus* sp. BHDRDI in Dualkultur mit dem Ascomyceten *Acremonium alternatum* Stamm 2003. (A)

Frisch angeimpfte Dualkulturen. (B) Dualkulturen zum Zeitpunkt der Ernte (9. Tag).

Dualkultur in jeweils 4 Parallelen. Vergleicht man die Kurvenverläufe (Abb. 21), so zeigen die beiden Ansätze keine signifikanten Unterschiede.

Vergleicht man die absoluten Ethylen-Werte vom Wildtyp und der intronlosen Mutante miteinander, so zeigen *Azoarcus* sp. BH72 mit $7,65 \pm 2,1 \mu\text{mol}$ bzw. die Mutante BHDRDI mit $7,66 \pm 3,1 \mu\text{mol}$ Ethylen keinen signifikanten Unterschied.

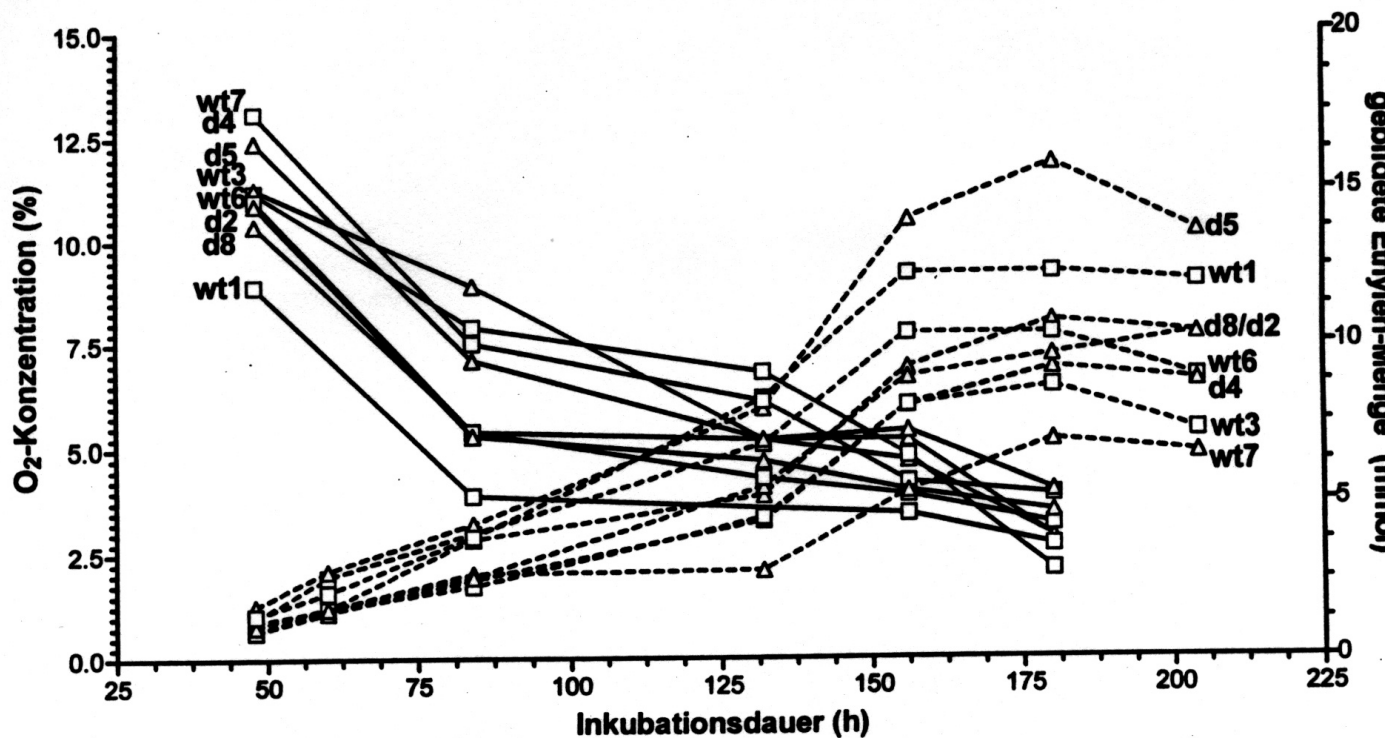


Abb. 21: Sauerstoffabnahme bzw. Ethylenzunahme von *Azoarcus* sp. BH72 (\square) sowie der Mutante BHDRDI (Δ) in Dualkultur.

Es wurden die Werte von jeweils 4 Parallelen aufgetragen. Durchgezogene Linien, O_2 -Konzentration; gestrichelte Linien, Ethylen-Akkumulation pro Kolben.

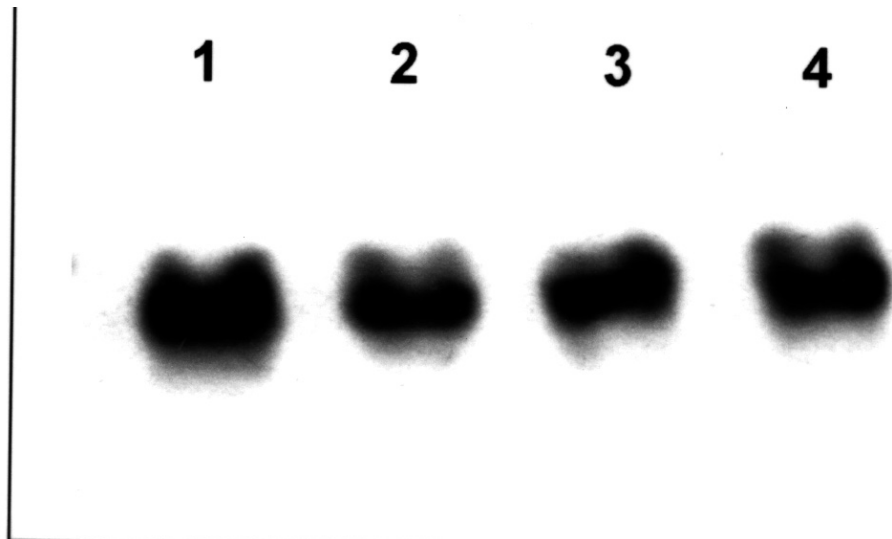
Dies läßt darauf schließen, daß sich *Azoarcus* sp. BH72 und die Mutante *Azoarcus* sp. BHDRDI im hyperinduzierten Zustand nicht signifikant unterscheiden, d.h. sich die Introndeletion nicht nachweisbar auf die effiziente Stickstofffixierung während der Hyperinduktion auswirkt.

4.6.3 Westernblot-Analyse mit Proteinextrakten aus in Dualkultur angezogenen Bakterienzellen

Um zu überprüfen, ob den während der Dualkultur gemessenen Ethylenwerten auch gleiche Bakterienmengen zugeordnet werden konnten, d.h. die Werte aufgrund identischer Bakterienkonzentrationen in den Dualkulturen von *Azoarcus* sp. BH72 und sp. BHDRDI vergleichbar sind, wurde zur Quantifizierung eine Westernblot-Analyse durchgeführt. Dabei wurden die Proteine aus den geernteten Bakterien/Pilzmycel-Dualkulturen extrahiert und auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt (3.8.3). Mit einem Antikörper gegen das Eisenprotein der Nitrogenase aus *Rhodospirillum rubrum* konnte dieses Protein im Westernblot nachgewiesen werden. Durch die Größe des Proteinsignals sowie die in gleichen Mengen aufgetragene Proteinmenge war es möglich, die Proteinmengen der aufgetragenen Mengen zueinander und so die Bakterienkonzentrationen abzuschätzen.

Abb. 22: Westernblot-Analyse verschiedener Proteinextrakte aus Dualkulturen von *Azo-arcus* sp. BH72 (Spur 2,3) und der Mutante *Azoarcus* sp. BHDRDI (Spur 1,4).

Zur Westernblot-Reaktion wurden Antikörper gegen das Eisen-protein der Nitrogenase, NifH aus *Rhodospirillum rubrum* ein-gesetzt.



Wie Abb. 22 zeigt, läßt sich in der Westernblot-Analyse kein signifikanter Unterschied in der Nitrogenase-Proteinmenge zwischen *Azoarcus* sp. BH72 und der Mutante *Azoarcus* sp. BHDRDI erkennen. Dies bestätigt die schon durch den Verlauf der Dualkulturen und die Messung der Ethylenkonzentration erhaltenen Werte.

4.6.4 Elektronenmikroskopische Quantifizierung membranhaltiger Zellen von *Azoarcus* sp. BH72 und der Mutante *Azoarcus* sp. BHDRDI

Um zu verifizieren, ob die gemessenen Acetylenreduktionswerte tatsächlich auf die effiziente Stickstofffixierung während der Hyperinduktion zurückzuführen sind, wurden Bakterien aus den analysierten Dualkulturen elektronenmikroskopisch auf den Anteil an Diazosomen, d.h. membranstapelhaltiger Zellen untersucht. Gleichzeitig sollte ein möglicher Einfluß der Introndeletion auf die Ausbildung der Membranstapel nachgewiesen werden. Dazu wurde den zur Proteinextraktion ausgewählten Dualkulturansätzen von *Azoarcus* sp. BH72 und der Mutante *Azoarcus* sp. BHDRDI Pilzmyzel entnommen, an das die Bakterien eng angeheftet vorliegen. Die Myzelstücke wurden dehydriert, eingebettet, am Ultramikrotom geschnitten und die Präparate am Transmissionselektronenmikroskop mikroskopiert (3.13). In den Auszählungen zeigte sich, daß im Wildtyp *Azoarcus* sp. BH72 im Durchschnitt in 1 % der Zellen Membranstapel beobachtet werden konnten. In der Mutante *Azoarcus* sp. BHDRDI zeigten jedoch ca. 4,5 % aller Zellen die Ausbildung der Diazosomen. Dies könnte darauf hindeuten, daß während der Hyperinduktion ein positiver Einfluß der Introndeletion auftritt, der sich nicht durch die Stickstofffixierungswerte charakterisieren läßt, sich jedoch in einem vermehrten Auftreten der Diazosomen widerspiegelt.

Die Dualkulturen mit dem Ascomyceten zeigten in allen Versuchen keine optimale Stickstofffixierung, nur ein Drittel der erwarteten Stickstofffixierungsraten (Hurek *et al.*, 1995b) wurden erreicht. Dies wirkt sich auch auf die Ausbildung der Membranen aus, da unter optimalen Bedingungen im Durchschnitt 30-40 % der *Azoarcus* sp. BH72-Zellen in Dualkultur Diazosomen ausbilden. Daher ist ein Vergleich der Diazosomenausbildung unter den oben beschriebenen Vorgaben nur eingeschränkt möglich.

4.7 Überprüfung der Mutante *Azoarcus* sp. BHDRDI durch Komplementation mit *ileX*

Da die Introndeletionsmutante BHDRDI unter aeroben sowie stickstofffixierenden Bedingungen ein signifikant schlechteres Wachstum zeigte, sollte durch die Komplementation dieser Mutation nachgewiesen

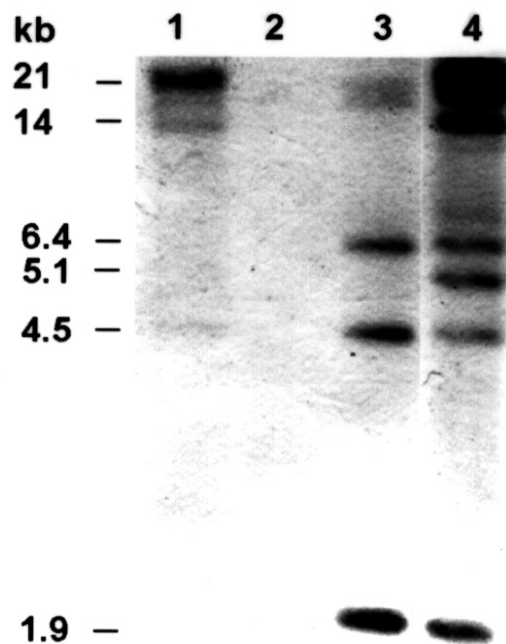
werden, daß der beschriebene Phänotyp auf die Deletion des Introns zurückzuführen ist. Damit sollte ausgeschlossen werden, daß der beobachtete Phänotyp durch eine andere, zufällig parallel entstandene Mutation im Genom verursacht wurde.

4.7.1 Aerobe Wachstumskurve mit der komplementierten Mutante

Zur Komplementation wurde die Mutante *Azoarcus* sp. BHDRDI mit dem Plasmid pBGB24 transformiert, das über homologe Rekombination in das Genom integrierte. Diese Plasmid enthielt ein 4,1 kb großes, den *ileX*-Gen-Bereich umfassendes, Fragment aus *Azoarcus* sp. BH72 (Stommel, 1994). Diese Mutante wurde *Azoarcus* sp. BHDRDIK benannt. Die Integration gewährleistete, daß die intakte, zusätzlich in die Zelle eingebrachte Kopie des *ileX*-Gens nur in einer Kopie im Genom vorlag und nicht auf einem Plasmid in höherer Kopienzahl. Als vergleichende Kontrolle wurde der Wildtyp *Azoarcus* sp. BH72 ebenfalls mit dem Plasmid pBGB24 transformiert, das auch wieder über homologe Rekombination ins Genom rekombinierte. Dadurch sollte ausgeschlossen werden, daß Effekte verglichen werden, die auf einen Kopieneffekt des *ileX*-Gens zurückzuführen sind. Der Kontrollstamm wurde *Azoarcus* sp. BH72K benannt. Die erfolgreiche Rekombination des Plasmids pBGB24 in die genomische DNA der beiden Stämme wurde in einer Southern-Hybridisierung überprüft (Abb. 23).

A b b . 2 3 :
Southern-Hybridisierung zur
Kontrolle der Integration des
Plasmids pBGB24 in BHDRDIK
(3) bzw. BH72K (4).

Als Kontrolle wurde genomische
DNA von *Azoarcus* sp. BH72 (1)
und sp. BHDRDI (2) eingesetzt.
Die genomische DNA wurde mit
Hind III behandelt und als Sonde
ein 0,21 kb großes, mit den
Primern MS2 und BR10 in der
PCR amplifiziertes Fragment
verwendet, daß sich über den
Intron-Bereich von *Azoarcus* sp.
BH72 erstreckt.



Der Wachstumsvergleich der beiden Stämme wurde unter aeroben Bedingungen durchgeführt (siehe 4.5.1). Die Kulturen wurden über den exponentiellen Bereich angezogen und vor Übergang in die stationäre Phase in frisches Medium überimpft. So war es möglich, die Bakterien über eine Dauer von 28 Generationen exponentiell wachsen zu lassen.

Es wurden jeweils drei parallele Wachstumskurven angesetzt, bei denen beide Stämme in der Animpfmenge ungefähr gleich zueinander eingestellt worden waren. Die beiden, im selben Kulturgefäß befindlichen Stämme konnten über intronspezifische PCR differenziert werden, mit der durch die Fragmentgröße des PCR-Produkts zwischen intronhaltiger und intronloser Kopie unterschieden werden konnte, da in der PCR-Reaktion nur bei der komplementierten Deletionsmutante BHDRDIK das kleinere intronlose Fragment amplifiziert werden

konnte (4.3.1).

Die durch die Auswertung der intronspezifischen PCR-Produkte erhaltene Verteilung der Stämme während der Wachstumskurve, stellte den Anteil von *Azoarcus* sp. BH72K sowie der Mutante sp. BHDRDIK über einen Zeitraum von 28 Generationen dar. Wie Abb. 24 zeigt, stieg der Anteil der komplementierten BHDRDIK-Zellen im Verlauf der Wachstumskurve von 53% auf 83% an. Der Anteil der Mutanten-Zellen nahm dagegen um 30% von 47% auf 17% ab.

Die komplementierte Mutante BHDRDIK zeigte im Gegensatz zum komplementierten intronhaltigen Wildtyp BH72K eine signifikante Anreicherung. Das Ergebnis der Wachstumskurve zeigt, daß sich der Phänotyp der Introndeletion komplementieren läßt. Die komplementierte Mutante BHDRDIK zeigt unter aeroben Bedingungen sogar ein deutlich besseres Wachstum als der Wildtyp *Azoarcus* sp. BH72K.

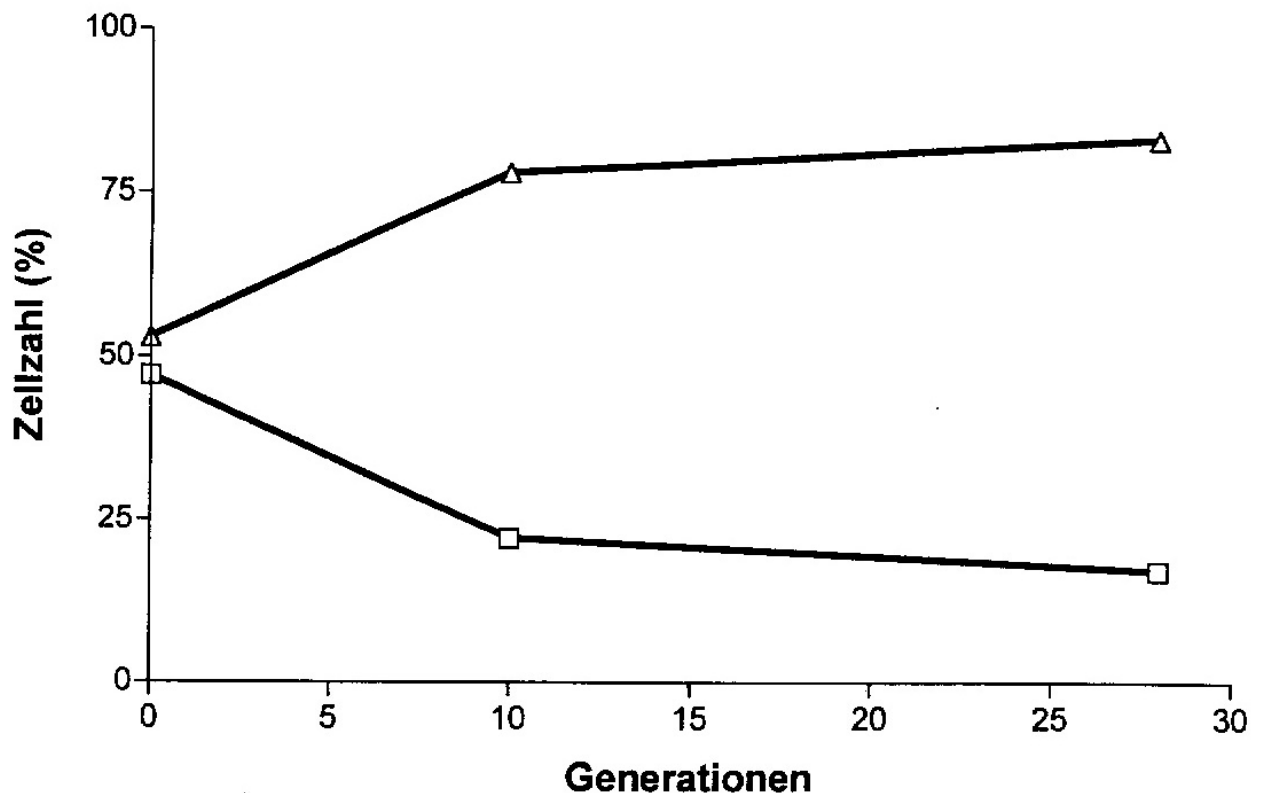


Abb. 24: Verhältnis der komplementierten Stämme *Azoarcus* sp. BH72K (□) sowie der Mutante *Azoarcus* sp. BHDRDIK (Δ) im Wachstumsvergleich unter aeroben Wachstumsbedingungen in stickstoffhaltigem Medium.

Diese Beobachtung läßt sich vermutlich auf einen sich negativ auswirkenden Kopieneffekt zurückführen, da der Kontrollstamm *Azoarcus* sp. BH72K zwei intakte Kopien des *ileX*-Gens enthält.

4.7.2 Effekt der Kopienzahl von *ileX* auf das Wachstum

Um das oben beschriebene Wachstum des Stammes BH72K mit dem Wildtyp *Azoarcus* sp. BH72 zu vergleichen, wurden diese beiden Stämme unter aeroben Bedingungen angezogen. So sollte festgestellt werden, ob die Integration der zweiten Kopie des *ileX*-Gens in dem Stamm BH72 das Wachstum negativ beeinflusst. Wie im vorgestellten Versuch wurden wieder drei parallele Wachstumskurven angesetzt. Die Kulturen wurden über eine Dauer von 28 Generationen exponentiell angezogen. Die Differenzierung der beiden im selben Kulturgefäß angezogenen Stämme erfolgte über die Ampicillin-Resistenz von BH72K.

Untersuchungen zur Funktion und Verbreitung

Durch Replika-Plattieren von Agarplatten ohne Antibiotikum auf Selektivplatten mit Ampicillin konnte abgeschätzt werden, in welchem Verhältnis die beiden Stämme zueinander vorlagen. Als Kontrolle wurde parallel eine Reinkultur von BH72K über den gleichen Zeitraum unter den gleichen Bedingungen ohne Antibiotikum angezogen. Am Anfang und Ende der Wachstumskultur wurden Proben gezogen und das Verhältnis ampicillinresistenter zu ampicillinsensitiven Zellen bestimmt. So sollte ausgeschlossen werden, daß während der vergleichenden Wachstumskurve von *Azoarcus* sp. BH72 und sp. BH72K das genomisch inserierte Plasmid aus dem Chromosom verloren geht, da die Zellen während der oben beschriebenen Wachstumskurve ohne Antibiotikum angezogen wurden. Der Verlust des Plasmids während der Wachstumskurve würde den Wildtypzustand wiederherstellen und das Ergebnis der Wachstumskurve verfälschen. Die durch Replika-Plattieren erhaltene Verteilung der Stämme stellte den Anteil von *Azoarcus* sp. BH72 sowie sp. BH72K während der Wachstumskurve über einen Zeitraum von 32 Generationen dar. Wie in Abb. 25 dargestellt ist, wurde der Wildtyp *Azoarcus* sp. BH72 gegenüber der genomischen Mutante sp. BH72K stark angereichert.

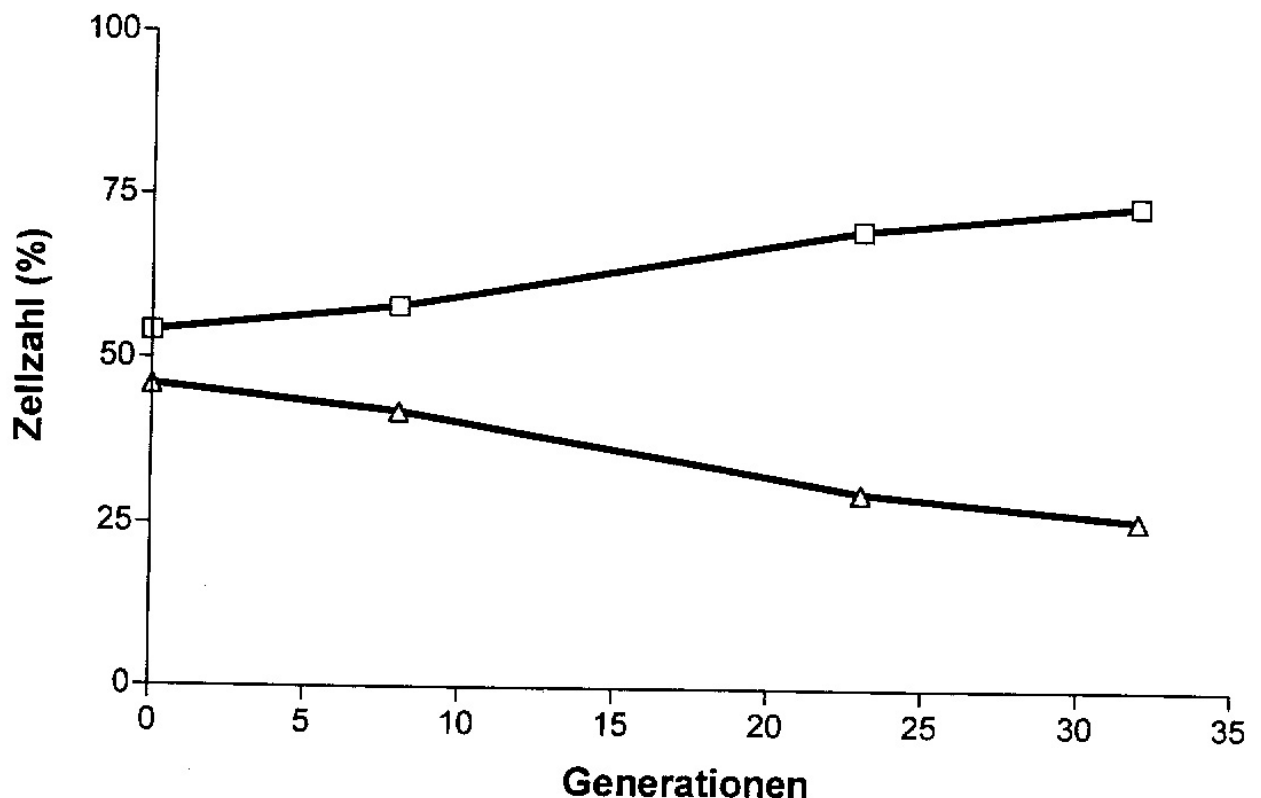


Abb. 24: Verhältnis des komplementierten Stamm *Azoarcus* sp. BH72K (Δ) zum Wildtyp *Azoarcus* sp. BH72 (\square) in der vergleichenden Wachstumskurve unter aeroben Wachstumsbedingungen in stickstoffhaltigem Medium.

So stieg der Anteil von *Azoarcus* sp. BH72 im Verlauf der Wachstumskurve von 54% auf 74% an, während die Konzentration der *Azoarcus* sp. BH72K-Zellen um 20% von 46% auf 26% abnahm. Dies weist darauf hin, daß die zweite auf dem Plasmid pBGB24 ins Genom gebrachte Kopie des *ileX*-Gens einen erheblichen Einfluß auf den Stoffwechsel der Zelle hat und somit zu einem schlechteren Wachstum in dieser Mutante im Vergleich mit dem Wildtyp führt. In der Reinkultur von BH72K konnten über den gesamten Zeitraum der Wachstumskurve keine Bakterien nachgewiesen werden, die die Ampicillinresistenz und somit das Plasmid pBGB24 verloren hatten. Somit konnte eine Veränderung der Wachstumskurve durch spontane genomische Revertanten ausgeschlossen werden.

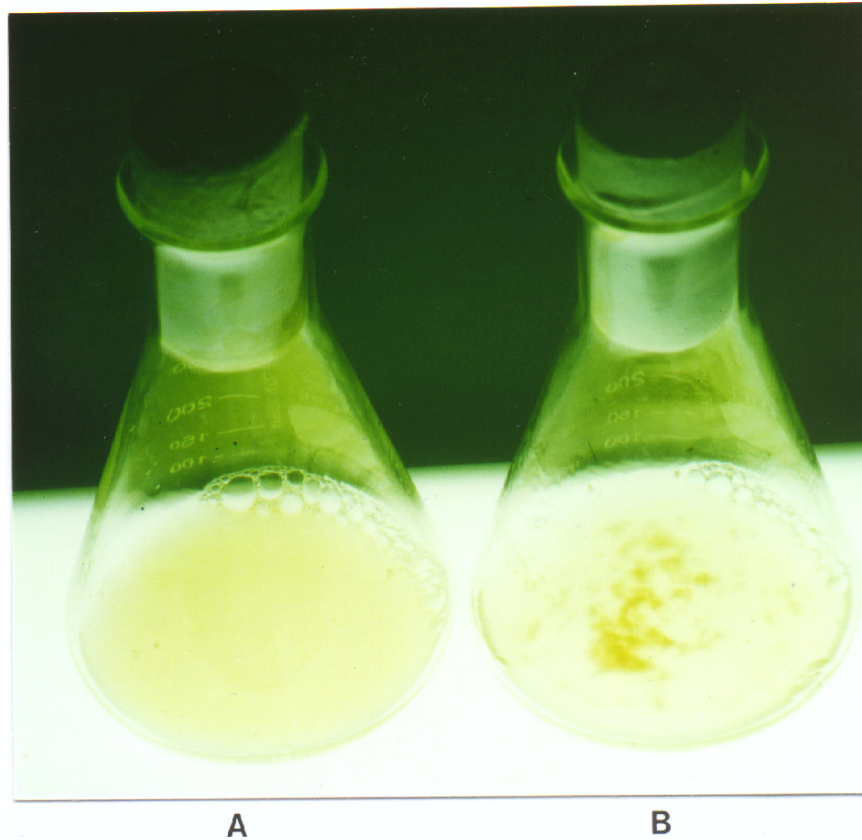
4.8 Untersuchungen zum Phänotyp von *Azoarcus* sp. BHDRDI in der spät- stationären Wachstumsphase

Untersuchungen zur Funktion und Verbreitung

Wurden Kulturen von *Azoarcus* sp. BHDRDI unter aeroben Bedingungen in Vollmedium (3.2.2) über einen Zeitraum von mehreren Tagen schüttelnd inkubiert, so zeigte sich nach 10-14 Tagen Inkubationsdauer eine Veränderung der Kultur. Die dichtgewachsene spät-stationäre Kultur wurde inhomogen und es zeigte sich eine Verklumpung der Bakterienzellen zu Aggregaten (Abb. 26).

Abb.26: Spätstationäre Kulturen vom Wildtyp *Azoarcus* sp. BH72 (A) und der Deletionsmutante *Azoarcus* sp. BHDRDI (B).

Deutlich erkennbar im Kolben (B) die entstandenen Aggregate. Die Kulturen wurden zeitgleich angeimpft und 10-14 Tage inkubiert.



Das Auftreten dieser Aggregate konnte unter den oben beschriebenen Bedingungen auch bei Kulturen des Wildtyps *Azoarcus* sp. BH72 beobachtet werden. Diese Veränderungen traten jedoch erst 5-10 Tage später auf.

4.8.1 Fluoreszenzmikroskopische Analyse von *Azoarcus* sp. BH72 und der Mutante *Azoarcus* sp. BHDRDI

Zur Charakterisierung dieses mehrfach reproduzierten Phänotyps wurden Zellen von *Azoarcus* sp. BH72 und der Mutante *Azoarcus* sp. BHDRDI aus der gleichen spätstationären Wachstumsphase mikroskopiert. Die Kultur der intronlosen Mutante hatte zu diesem Zeitpunkt schon die Bakterien-Aggregate ausgebildet. Um zwischen lebenden und toten Zellen in Bakterienkulturen der spätstationären Phase zu differenzieren, wurden diese mit zwei spezifischen Nukleinsäure-Farbstoffen (3.12) angefärbt (Abb. 27).

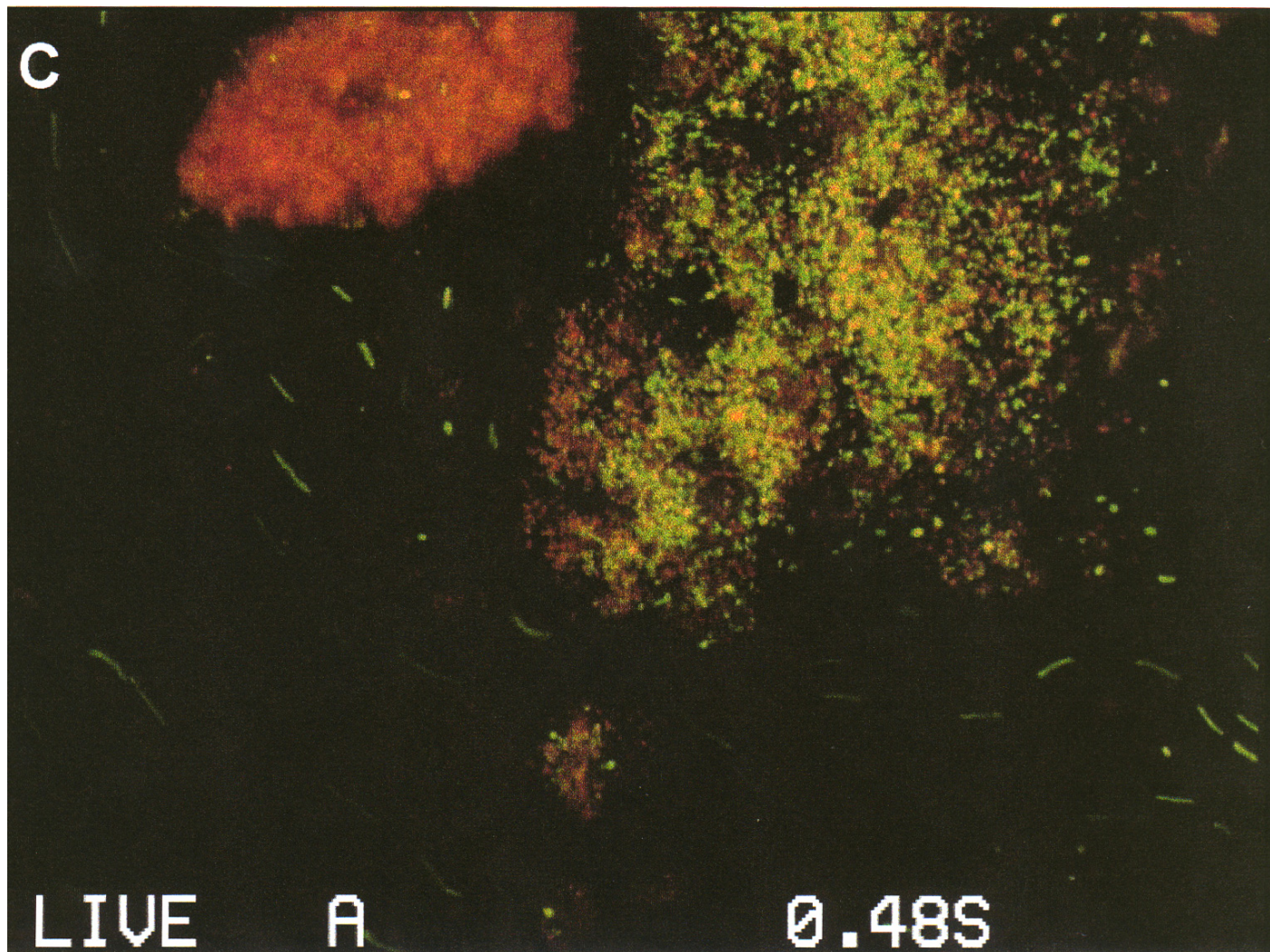
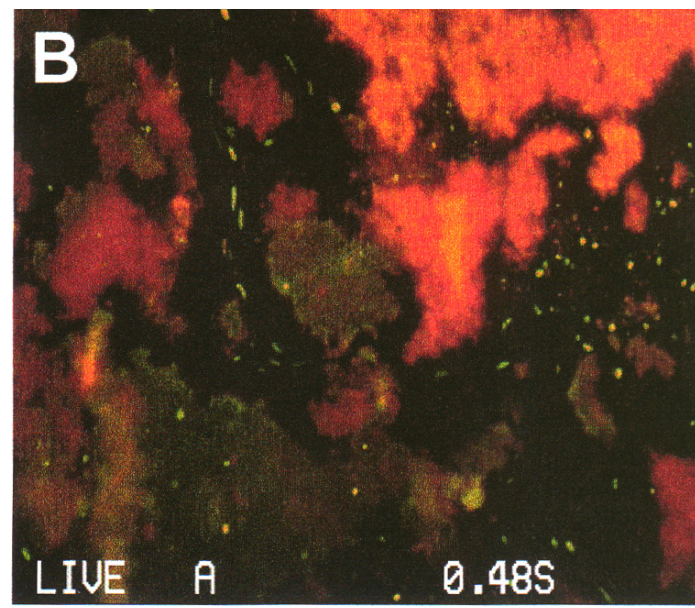
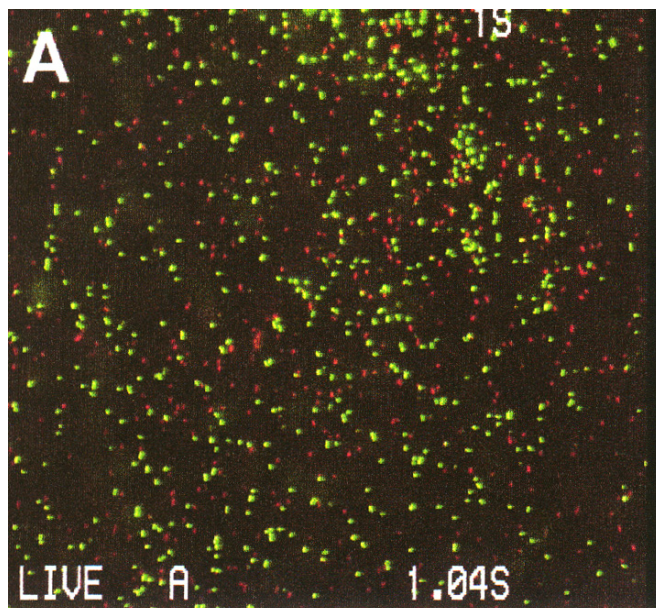


Abb. 27: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *Azoarcus* sp. BH72 (A) bzw. der Mutante *Azoarcus* sp. BHDRDI (B,C).

Untersuchungen zur Funktion und Verbreitung

Die Zellen wurden mit fluoreszierenden Farbstoffen angefärbt. Der Balken entspricht einer Größe von 50 µm.

Durch die Fluoreszenzfärbung sollte festgestellt werden, wie der Vitalzustand der Zellen ist, aus denen sich die Aggregate zusammensetzen. Weiterhin sollte sichtbar gemacht werden, in welchem Verhältnis vitale und abgestorbene Zellen in den untersuchten Kulturen zueinander stehen. Bei der Auszählung der mikroskopischen Analyse zeigte sich, daß im Durchschnitt 77 % Prozent der Zellen des Wildtyps *Azoarcus* sp. BH72 grün gefärbt waren. Sie könnten somit über die intakte Membran als lebende Bakterienzellen definiert werden. Die Kultur der Introndeletionsmutante *Azoarcus* sp. BHDRDI enthielt in den Auszählungen ca. 88 % grün-fluoreszierende, d.h. lebendige Zellen. Diese Angaben sind allerdings nur eingeschränkt verwertbar und ein Vergleich zwischen den Kulturen schwer möglich, da sich die aggregathaltige Bakterienkultur der Mutante BHDRDI nicht vollständig homogenisieren ließ. So können kleine, noch vorhandene Aggregate die Auszählungen der lebenden zu toten Zellen stark beeinträchtigen. Die Aggregatausbildung zeigte sich unter dem Mikroskop sehr heterogen. Teilweise schienen Aggregate nur aus abgestorbenen Zellen zu bestehen (Abb. 27b). Andere Aggregate enthielten einen großen Anteil an lebenden Zellen (Abb. 27c).

Es wäre möglich, daß es sich bei den verschiedenen Aggregatformen um einzelne Stadien der Aggregatzusammensetzung handelt. Aggregate, die zum größten Teil aus lebenden Zellen bestehen, wandeln sich durch das Absterben von Zellen in solche, die sich zum größten Teil aus toten Bakterien zusammensetzen. Daher lassen sich die von der Mutante *Azoarcus* sp. BHDRDI ausgebildeten Aggregate nur dahingehend charakterisieren, daß sie einen heterogenen Aufbau von lebenden und toten Zellen zeigen.

4.8.2 Charakterisierung des Phänotyps der Mutante *Azoarcus* sp. BHDRDI durch zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Da die Introndeletion sich auf die Konzentration funktioneller tRNA^{Ile} in der Zelle auswirken könnte, würde dies eventuell die Translation bestimmter Proteine beeinflussen, in deren Gensequenz das Isoleucin-Codon ATA einmal oder auch mehrmals vorliegt. Der deutliche Phänotyp von *Azoarcus* sp. BHDRDI in der spät-stationären Phase könnte durch eine veränderte Expression einzelner, davon betroffener Proteine entstanden sein. Um dies zu untersuchen, wurde eine vergleichende Analyse des Proteinmusters in der zweidimensionalen Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt. Der Vorteil dieser Methode liegt in der Auftrennung über zwei Proteinparameter. In der ersten Dimension, der isoelektrischen Focussierung, werden die Proteine anhand ihres isoelektrischen Punktes aufgetrennt. Die Auftrennung in der zweiten Dimension erfolgt über die Größe im denaturierenden Polyacrylamidgel. Aus bis zu dem Auftreten der Zellaggregate angezogenen, spät-stationären Kulturen von *Azoarcus* sp. BH72 und *Azoarcus* sp. BHDRDI wurde Gesamtprotein extrahiert (3.8.2), und eine 2D-Gelelektrophorese durchgeführt (3.8.4). Die mit Silberfärbung (3.8.4.2) behandelte elektrophoretische Auftrennung des Gesamtproteinextraktes von BHDRDI (Abb. 28 (B)) wurde nach Proteinen durchmustert, die im Vergleich zu den Wildtyp-Proteinmustern (Abb. 28 (A)), schwächer bzw. ganz verschwunden waren.

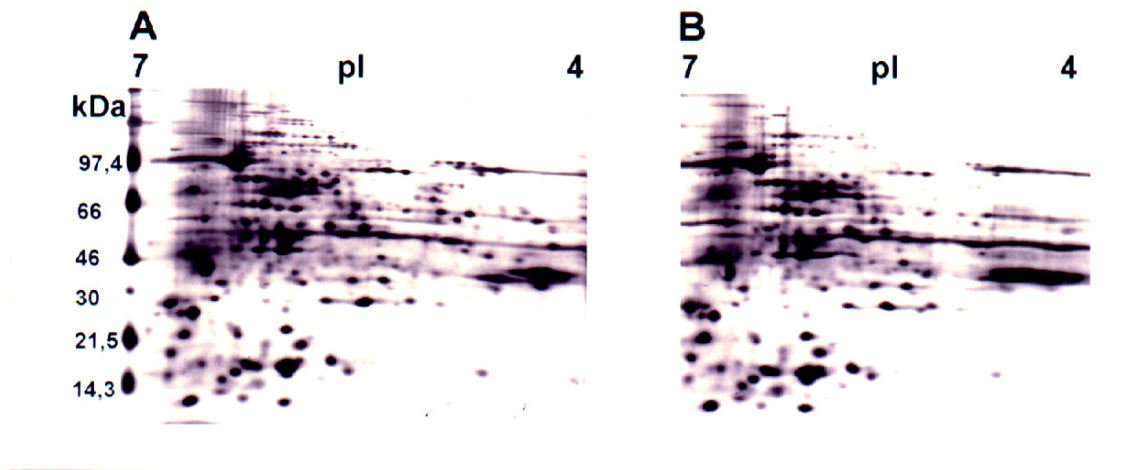


Abb.28: Zweidimensionale gelelektrophoretische Auftrennung der Gesamtprotein-Extrakte von *Azoarcus* sp. BH72 (A) und *Azoarcus* sp. BHDRDI (B).

Wie in Abb.28 zu sehen ist, gleichen sich die Proteinmuster von *Azoarcus* sp. BH72 und der Mutante *Azoarcus* sp. BHDRDI sehr stark. Es konnten keine Proteinpunkte gefunden werden, die im Proteinmuster der intronlosen Mutante reproduzierbar deutlich schwächer werden bzw. ganz verschwinden. Es ist möglich, daß die vorliegende Methode zum Vergleich der Proteinmuster nicht geeignet ist, da sie nur eine sehr grobe Quantifizierung der Proteinpunkte ermöglicht. Schwache Veränderungen der Proteinkonzentration können somit nicht erfasst werden.

4.9 Untersuchungen zur Auswirkung der Introndeletion auf die Translation in *Azoarcus* sp. BHDRDI durch Reportergen-Studien

Um zu erfassen, ob die Introndeletion einen Einfluß auf die Reifung der tRNA^{Ile} und somit auf Verfügbarkeit in der Translation hat, wurde ein Modellsystem konstruiert, mit dem diese Auswirkungen meßbar gemacht werden sollten. Ein möglicher Unterschied in der Verfügbarkeit der reifen tRNA

^{Ile} zwischen *Azoarcus* sp. BH72 und der introndeletierten Mutante BHDRDI könnte so nachgewiesen werden. Das *uidA*-Gen aus *Escherichia coli* kodiert für das Enzym β -Glucuronidase. Das Genprodukt dieses Reportergens spaltet ein chromophores Substrat, daß sich photometrisch quantifizieren läßt (Jefferson *et al.*, 1986). Das *uidA*-Gen enthält in seiner Gensequenz 30 Codons für die Aminosäure Isoleucin, davon 3 für das Isoleucin-Codon ATA. Durch Expression des Gens in *Azoarcus* sp. BH72 und vergleichend der Mutante *Azoarcus* sp. BHDRDI sollte in Reportergen-Tests herausgefunden werden, ob sich durch das Auftreten der drei ATA-Codons und den dadurch bestehenden Bedarf an tRNA^{Ile} eine meßbare Veränderung in der Konzentration des Genproduktes β -Glucuronidase nachweisen läßt.

4.9.1 Konstruktion eines Plasmids zur Expression des *uidA*-Gens in *Azoarcus* sp.

Um das promotorlose *uidA*-Gen in *Azoarcus* sp. exprimieren zu können, sollte das in dem Vektor pBlueskript KS (+/-) Phagemid (Stratagene, Heidelberg) vorliegende Gen vor einen in *Azoarcus* erkannten konstitutiven Promotor kloniert werden. Dazu wurde der Promotor der Kanamycin-Kassette von pUC 4K (Pharmacia Biotech, Freiburg) ausgewählt, der in *Azoarcus* sp. BH72 erkannt wird (B. Reinhold-Hurek, persönliche Mitteilung). Das *uidA*-Gen wurde aus dem Plasmid pUIDAKS mit den den Restriktionsenzymen *Sma* I und *Hind* III in den mit den gleichen Enzymen geschnittenen Vektor pUC4K ligiert. Dabei wurde ein

Untersuchungen zur Funktion und Verbreitung

240 bp großes Fragment 450 bp stromabwärts des Transkriptionsstarts der Kanamycin-Kassette ausgeschnitten und gegen die Sequenz des *uidA*-Gens ersetzt. Das Konstrukt wurde als pUC4KUIDA benannt. Dieses Konstrukt wurde dann in den Vektor pBBRMCS III (Kovach *et al.*, 1995) kloniert, der ein breites Wirtsspektrum bei Gram-negativen Bakterien hat und sich in *Azoarcus* sp. BH72 selbst replizieren kann. Dazu wurde aus pUC4KUIDA durch Schneiden mit *Pst* I das 2558 bp große Fragment in die *Pst* I-Schnittstelle des Polylinkers von pBBRMCSIII eingesetzt. Dieses fertige Reportergen-Konstrukt wurde als pMSKUIDA13 bezeichnet.

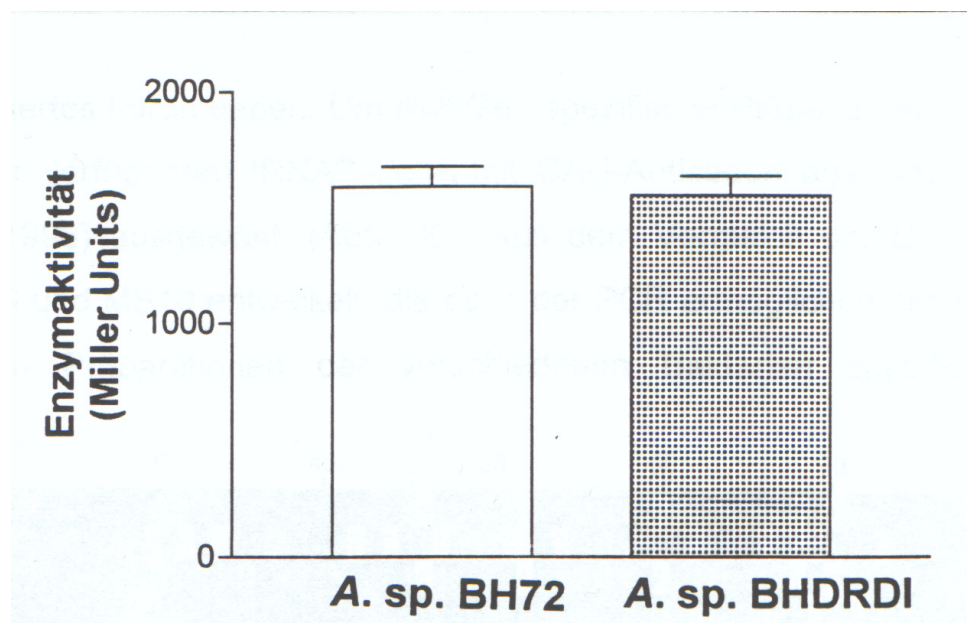
4.9.2 Vergleichende quantitative Reportergens-Tests in *Azoarcus* sp. BH72 und der Mutante *Azoarcus* sp. BHDRDI

Zur vergleichenden Messung der Translations-Effizienz wurde das Konstrukt pMSKUIDA13 in den Wildtyp *Azoarcus* sp. BH72 und die Mutante *Azoarcus* sp. BHDRDI transformiert (3.6.2). Die entstandenen genomischen Reporterstämme *Azoarcus* sp. BH72GUS bzw. *Azoarcus* sp. BHDRDIGUS wurden in die quantitative Messung der Substratumsetzung des *uidA*-Genprodukts β -Glucuronidase (3.14) eingesetzt. Es wurden drei parallele Testansätze mit jeweils 8-16 Messungen von aerob, exponentiell wachsenden Zellen durchgeführt.

Abb. 29: Vergleich der Reportergen-Stämme BH72GUS und BHDRDIGUS in quantitativen Bestimmungen der

Enzymaktivität der Glucuronidase.

Die Balken geben die Standardabweichung an.



Wie in Abb. 29 dargestellt, zeigen die Reporterstämme *Azoarcus* sp. BH72GUS mit $1584 \pm 88,49$ Miller-Units bzw. *Azoarcus* sp. BHDRDIGUS mit $1549 \pm 80,83$ Miller-Units keinen signifikanten Unterschied in der Enzymaktivität. Dies deutet darauf hin, daß durch die drei ATA-Codons im *uidA*-Gen kein so hoher Bedarf an tRNA

entstanden ist, daß ein bei der Translation des Glucuronidase-Transkripts entstandener Mangel sich auf die Synthese des Enzyms auswirkt. Ein dadurch erwarteter Unterschied zwischen den beiden Reporterstämmen war im Enzymtest nicht meßbar.

4.10 Untersuchungen zur Verbreitung von Gruppe-I Introns in Bacteria

Untersuchungen zur Funktion und Verbreitung

Seit der Entdeckung von Gruppe-I Introns in tRNA-Genen von Cyanobakterien (Kuhse *et al.* 1990; Xu *et al.*, 1990), den ersten nachgewiesenen Introns in Bacteria, konnten Introns auch in voneinander systematisch verschiedenen bakteriellen Organismen gefunden werden. Daher sollte die Verbreitung von Introns der Gruppe I innerhalb der Gattung *Azoarcus* sowie anderer Bakterienstämme untersucht werden, um daraus mögliche Rückschlüsse auf die Verwandtschaft der untersuchten Gruppe I-Introns zueinander zu ziehen. Dazu wurden verschiedene Ansätze zur Suche nach Gruppe-I Introns entwickelt und optimiert.

4.10.1 Entwicklung eines PCR-Systems zur spezifischen Amplifikation von tRNA^{Ile}- Genen

Um die Genome der verschiedenen Bakterienstämme systematisch nach Gruppe-I Introns in tRNA

^{Ile}-Genen zu durchsuchen, sollte ein Primersystem entwickelt werden, das mittels PCR spezifisch das *ileX*-Gen amplifiziert. Die Größe der erhaltenen Fragmente sollte Rückschlüsse auf ein möglicherweise inseriertes Intron geben. Um *ileX*-Gen-spezifische Primer zu entwickeln, wurden die Sequenzen aller verfügbaren tRNA^{Ile}-Gene mit CAU-Anticodon aus einer tRNA-Datenbank (Sprinzl *et al.*, 1996) ausgewählt (Abb. 30). Aus dem Vergleich der Sequenzen wurden die zwei Primer MS9 und MS10 entwickelt, die es in der PCR ermöglichen sollten, das *ileX*-Gen aus genomischen Präparationen der verschiedenen Bakterien spezifisch zu amplifizieren.

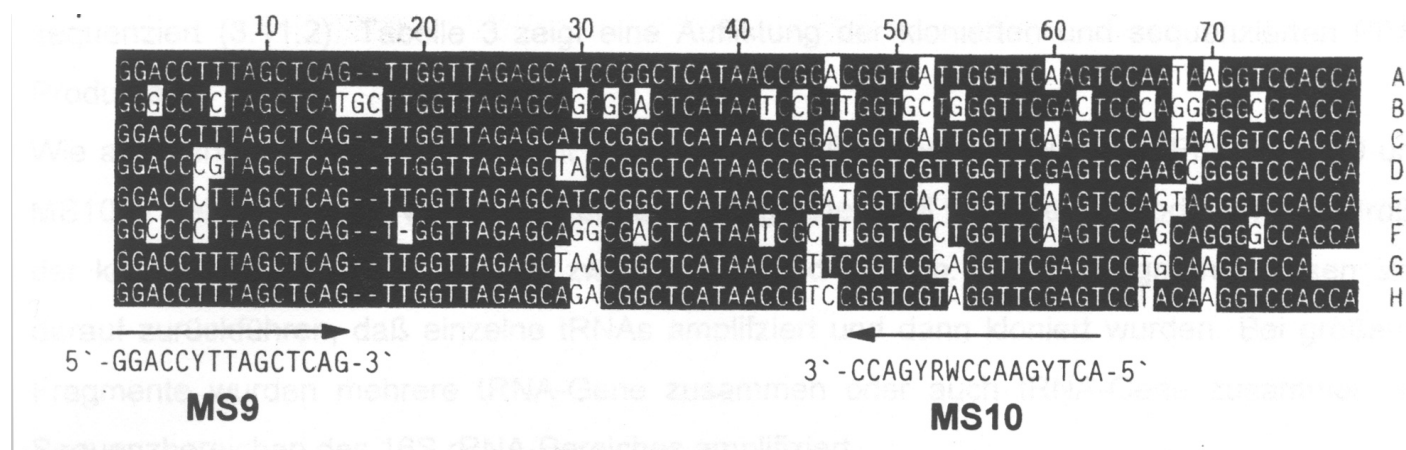


Abb. 30: Sequenzvergleich der tRNA^{Ile}-Gene aus verschiedenen Bacteria zur Ableitung der Primer MS9 und MS 10.

Die Pfeile geben die Richtung der Primer an. A, *Azoarcus* sp. BH72; B, *Mycoplasma capricolum*; C, *Mycoplasma mycoides*; D, *Acholeplasma laidlawii*; E, *Spiroplasma melliferum*; F, *Escherichia coli*; G, *Bacillus subtilis*; H, *Staphylococcus aureus*. Y,(G/A); R,(C/T); W,(T/A); Basendefinition nach IUPAC-Code.

Mit den entwickelten und Primern MS9 und MS10 wurden PCR-Reaktionen mit genomischer DNA verschiedener *Azoarcus*-Stämme sowie anderer Bakterienstämme durchgeführt (Abb. 31).

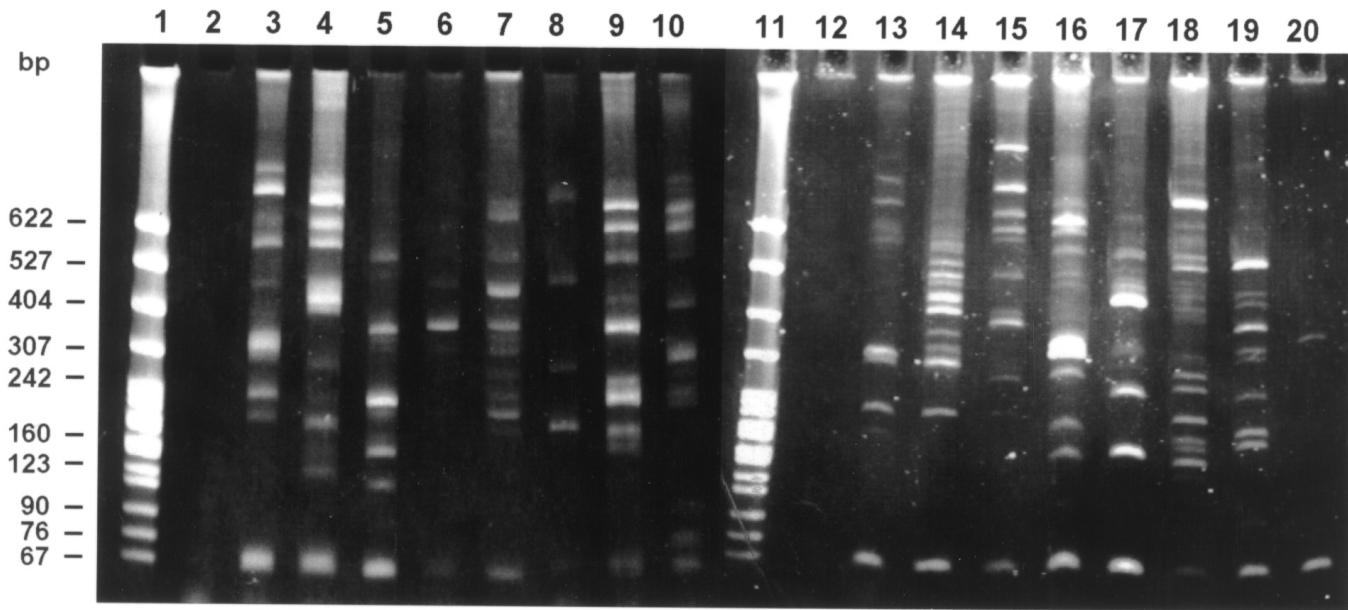


Abb. 31: Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Reaktionen verschiedener Bakterienstämme. Die Amplifikation erfolgte mit den Primern MS9 und MS10. **3**, *Azoarcus* sp. BH72; **4**, *Escherichia coli* DH5 α ; **5**, *Azoarcus communis* S2; **6**, *Azoarcus indigens* sp. VB32; **7**, *Azoarcus evansii*; **8**, *Azoarcus* sp. 6a3; **9**, *Azoarcus communis* sp. SWuB3; **10**, *Azoarcus* sp. S5b2; **13**, *Azoarcus* sp. BH72; **14**, *Acidovorax delafieldii* pall. 134t2; **15**, *Hydrogenophaga palleronii* RH2; **16**, *Aquaspirillum delicatum* NCBI9419; **17**, *Chorobium limicola* Tassajara, **18**, *Chloroflexus aurantiacus* J-10-f1; **19**, *Herbaspirillum seropedicae* Z67; **20**, *Azospirillum halopraeferens*; **1**, **11**, Größenstandard pBR322/*Msp* I; **2**, **12** Kontrollansatz ohne DNA.

Als Kontrolle wurde genomische DNA von *Escherichia coli* mit eingesetzt. Aus *E.coli* war die Sequenz des *ileX*-Gens bekannt und somit auch, daß in diesem tRNA-Gen kein Intron inseriert war. Intronhaltige Fragmente wurden in Fragmenten zwischen 200 -400 bp Größe erwartet. Um Aufschluß über die Sequenz der entsprechenden Fragmente in verschiedenen PCR-Ansätzen zu erhalten, wurden sie in den mit *Hinc* II behandelten pUC19-Vektor ligiert und dann sequenziert (3.11.2). Tabelle 3 zeigt eine Auflistung der klonierten und sequenzierten PCR-Produkte.

Wie aus Tabelle 3 hervorgeht, erhält man durch Amplifikation mit den tRNA-Primern MS9 und MS10 in vielen Fällen tRNA-Sequenzen, die zum größten Teil für Isoleucin codieren. Die Größe der klonierten Fragmente variierte zwischen 45 und 496 bp. Kleine Fragmente lassen sich darauf zurückführen, daß einzelne tRNAs amplifiziert und dann kloniert wurden. Bei größeren Fragmente wurden mehrere tRNA-Gene zusammen oder auch tRNA-Gene zusammen mit Sequenzbereichen des 16S rRNA-Bereiches amplifiziert.

Es ist seit langem bekannt, daß auch tRNA-Gene zwischen den Genen von 16S und 23S rRNA liegen (Inokuchi und Yamao, 1995).

Tabelle 3: Auflistung der klonierten und sequenzierten PCR-Produkte.

^A keine Homologien in Sequenzdatenbanken nachgewiesen; – tRNA^{Ile} enthält das CAU-Anticodon; genaue Stammbezeichnung siehe Abb. 31.

Klon	Organismus	Fragmentgröße/bp	Sequenz

Untersuchungen zur Funktion und Verbreitung

pMSAD1	Acidovorax delafieldii	219	/ A
pMSAD3	Acidovorax delafieldii	60	tRNA ^{Ala}
pMSAD4	Acidovorax delafieldii	304	tRNA ^{Ile} , tRNA ^{Ala}
pMSAD10	Acidovorax delafieldii	45	tRNA ^{Arg}
pMSAE11	Azoarcus evansii	282	tRNA ^{Ile} u 16s-rRNA-Bereich
pMSAE20	Azoarcus evansii	338	tRNA ^{Asn}
pMSCX123	Chlorobium limicola	496	/ A
pMSAQ42	Aquaspirillum delicatum	327	tRNA ^{Ile} - enthält Intron
pMSAQ48	Aquaspirillum delicatum	327	tRNA ^{Ile} - enthält Intron

In den zwei Klonen pMSAQ42 und pMSAQ48, die ein PCR-Produkt aus *Aquaspirillum delicatum* enthielten, wurde ein tRNA^{Ile}-Gen gefunden. Hinter dem 3. Anticodon-Nukleotid war eine 264 bp große Sequenz inseriert.

4.10.2 Charakterisierung des neu gefundenen Gruppe I Introns in *Aquaspirillum delicatum*

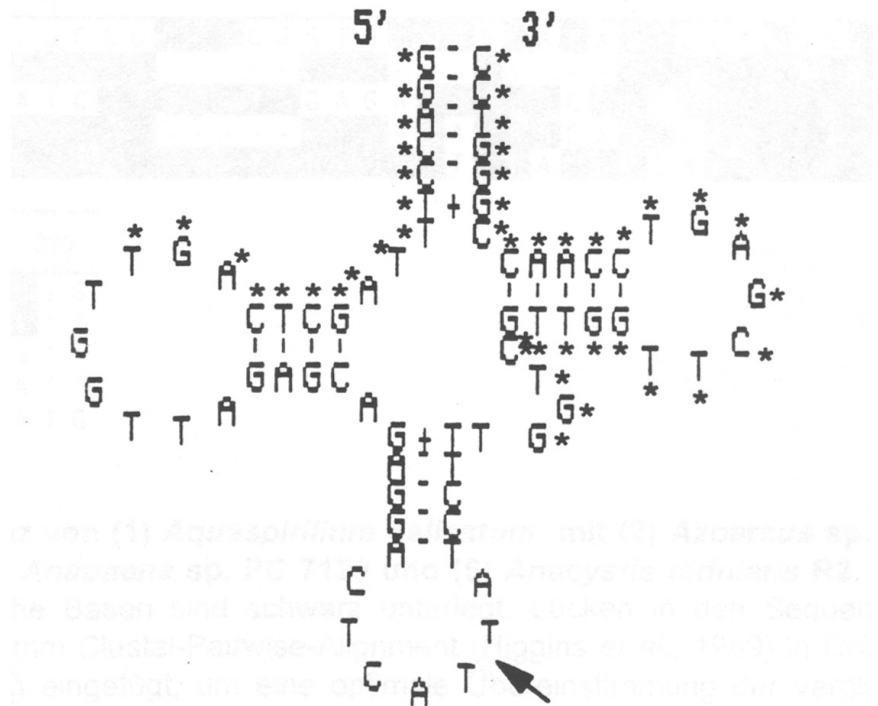
Um zu verifizieren, daß das gefundene Gen aus *Aquaspirillum delicatum* eine tRNA beinhaltet, sollte die Sequenz in einem speziellen Faltungsprogramm in die charakteristische Kleeblatt-Sekundärstruktur gefaltet werden.

Da die PCR-Primer nicht direkt am Anfang des 5'-bzw. 3'-Endes der gesuchten tRNAs binden, enthielt die gefundene 64 bp lange Sequenz nicht die eigenen 5'-bzw. 3'-liegenden Basen. Daher wurde die zu faltende Sequenz um die im PCR-Produkt fehlenden Basen ergänzt. Als Vorlage dazu wurde die Sequenz des tRNA^{Ile}-Gens aus *Azoarcus* sp. BH72 verwendet. Die Intronsequenz wurde in der Faltung nicht berücksichtigt. Wie Abb. 32 zeigt, faltet sich die Sequenz zu der Sekundärstruktur einer funktionellen tRNA^{Ile} mit einem CAU-Anticodon, wie schon aus *Azoarcus* sp. BH72, sowie auch anderen bakteriellen Organismen bekannt. Die Intronsequenz ist hinter dem dritten Anticodon-Nukleotid inseriert.

Abb.32: Sekundär-struktur, des
tRNA^{Ile}-Gens aus
Aquaspirillum delicatum.

Die Faltung erfolgte mit dem
Programm DNASIS der Firma
Pharmacia Biotech (Freiburg).
Der Pfeil zeigt die
Insertionsstelle des Introns; *
symbolisiert die im Primer
MS9 bzw. MS10 enthaltenen
sowie die aus der Sequenz von

A. sp. BH72 ergänzten Basen.



Die 264 bp lange Intronsequenz von *Aquaspirillum delicatum* wurde mit der Sequenz anderer schon bekannter, bakterieller Intronsequenzen verglichen (Abb. 33). Dazu wurden die Sequenzen von selbstspießenden Introns der Gruppe I aus *Azoarcus* sp. BH72, *Agrobacterium tumefaciens* (Reinhold und Shub, 1992), *Anabaena* sp. PC7120 (Kuhse *et al.*, 1990) und *Anacystis nidulans* R2 (Paquin *et al.*, 1997) verwendet.

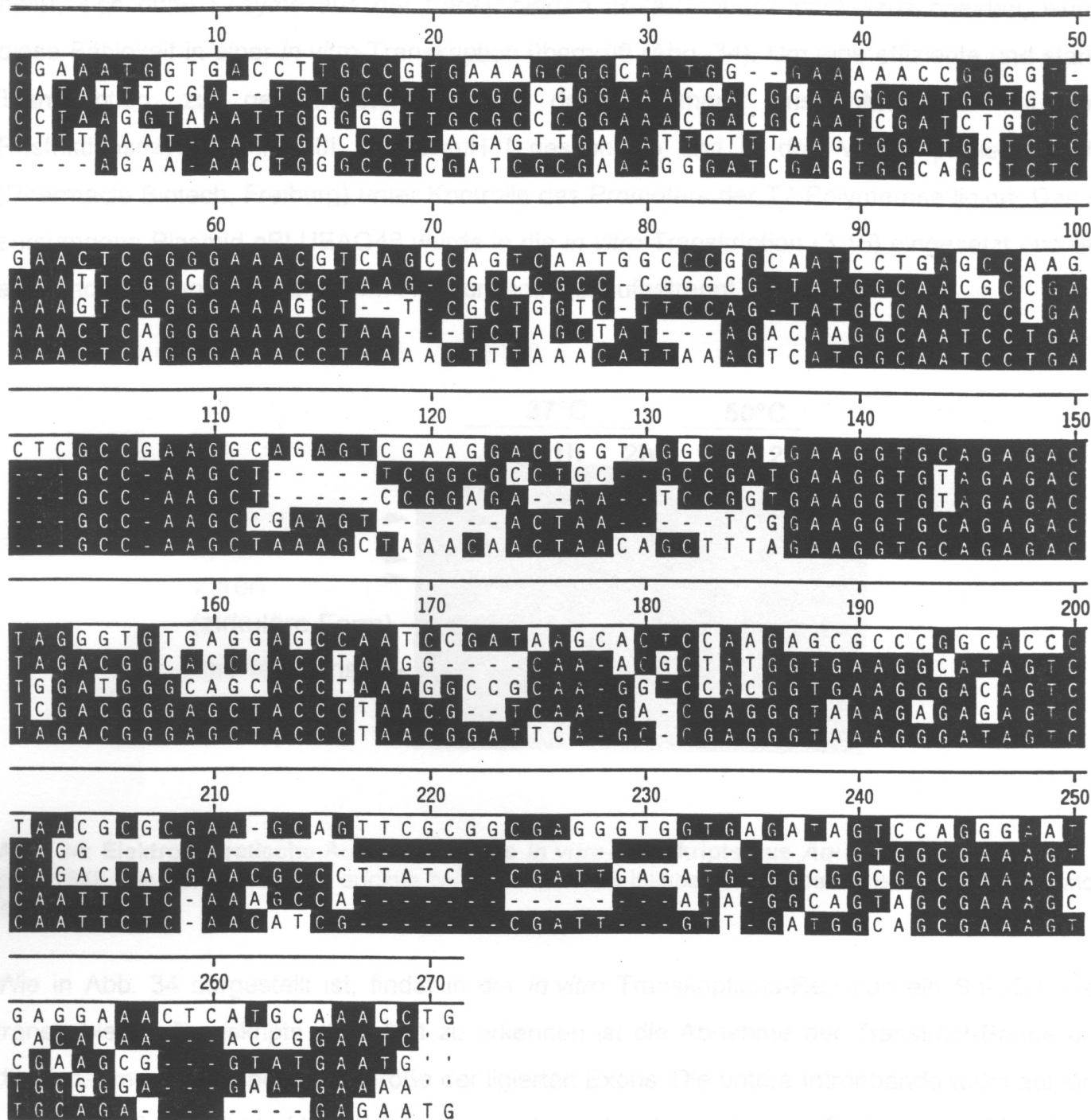


Abb.33: Vergleich der Intronsequenz von (1) *Aquaspirillum delicatum* mit (2) *Azoarcus* sp. BH72; (3) *Agrobacterium tumefaciens*; (4) *Anabaena* sp. PC 7120 und (5) *Anacystis nidulans* R2.

In zwei oder mehr DNA Sequenzen identische Basen sind schwarz unterlegt. Lücken in den Sequenzen (-) wurden von dem verwendeten Programm Clustal-Pairwise-Alignment (Higgins *et al.*, 1989) in DNASTAR Inc., (Lasergene, Madison), falls nötig eingefügt, um eine optimale Übereinstimmung der verglichenen Sequenzen zu erhalten.

In bestimmten konservierten Faltungsbereichen bestehen stark homologe Basensequenzen zu den Introns aus den anderen bakteriellen Organismen. Dies läßt darauf schließen, daß es sich bei der in das tRNA-Gen

inserierten Sequenz um ein Intron der Gruppe I handelt.

4.10.3 *In vitro*-Transkription zum Nachweis des Selbstspleißens

Um nachzuweisen, daß das Intron fähig ist, nach dem Gruppe I-Mechanismus zu spleißen, das heißt, sich ohne Enzyme aus der transkribierten tRNA-Sequenz herauszuschneiden, wurde diese Fähigkeit in einer *in vitro*-Transkription überprüft (Abb. 34). Um eine effiziente und starke Transkription zu gewährleisten, wurde das Fragment aus pMSAQ48 mit den Restriktionsenzymen *Hind* III und *Bam*HI geschnitten und in den Vektor pBlueskript KS (Pharmacia Biotech, Freiburg) unter Kontrolle des Promoters der T7-Polymerase ligiert. Das so entstandene Plasmid pBLUEAQ48 wurde in die *in vitro*-Transkription (3.15) eingesetzt und das entstandene Transkript auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt.

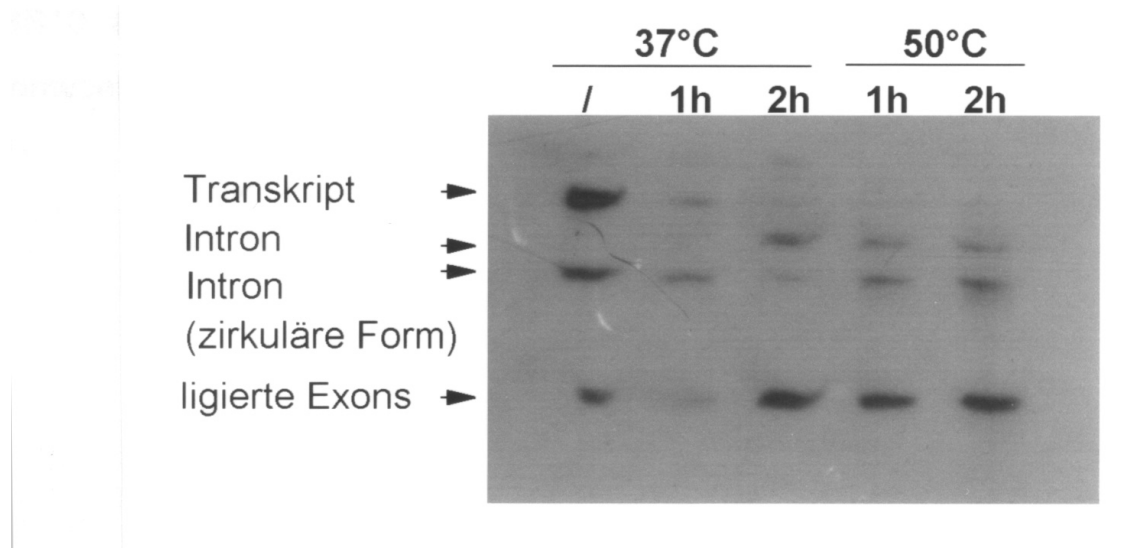


Abb. 34: Elektrophoretische Auftrennung des *in vitro*-Transkripts aus *Aquaspirillum delicatum* in pMSKS48.

Die Spleiß-Reaktion erfolgte bei verschiedenen Inkubations-temperaturen (37°C; 50°C) und -Zeiten (0;1;2 h).

Wie in Abb. 34 dargestellt ist, findet in der *in vitro* Transkriptions-Reaktion ein Spleißen des transkribierten Transkripts statt. Gut zu erkennen ist die Abnahme der Transkript-Bande und die Zunahme der Bande in der Größe der ligierten Exons. Die untere Intronbande weist auf eine alternative Sekundärstruktur des Introns, sehr wahrscheinlich eine Cyclisierung, hin. Diese Ergebnisse zeigen, daß es sich bei der im tRNA^{Ile}-Gen von *Aquaspirillum delicatum* inserierten Sequenz um ein selbstspleißendes Intron der Gruppe I handelt.

4.10.4 Entwicklung einer spezifischen Intronsonde zur Detektion von Introns in Bacteria

Da die Suche nach Introns über spezifische PCR und Klonierung der PCR-Fragmente sehr aufwendig und langwierig war, wurde alternativ eine Intronsonde aus *Aquaspirillum delicatum* formuliert. Mit dieser Sonde

Untersuchungen zur Funktion und Verbreitung

sollten PCR-Reaktionen verschiedener Stämme spezifisch nach intronhaltigen tRNA-Fragmenten durchmustert werden.

Als Sonde wurde ein 251 bp großes, mit den Primern MSAQF und MSAQR, durch PCR von dem Plasmid pBLUEAQ48 amplifiziertes Fragment verwendet. Zur Durchmusterung wurde genomische DNA verschiedener *Azoarcus*-Stämme in PCR-Reaktionen mit den Primern MS9 und MS10 amplifiziert (Abb. 35). Darunter neue, aus Wurzeln von Kallargras sowie aus Basidiomyceten-Sklerotien in Reisfeldboden isolierte Stämme (Hurek *et al.*, 1997)(siehe auch Abb. 2).

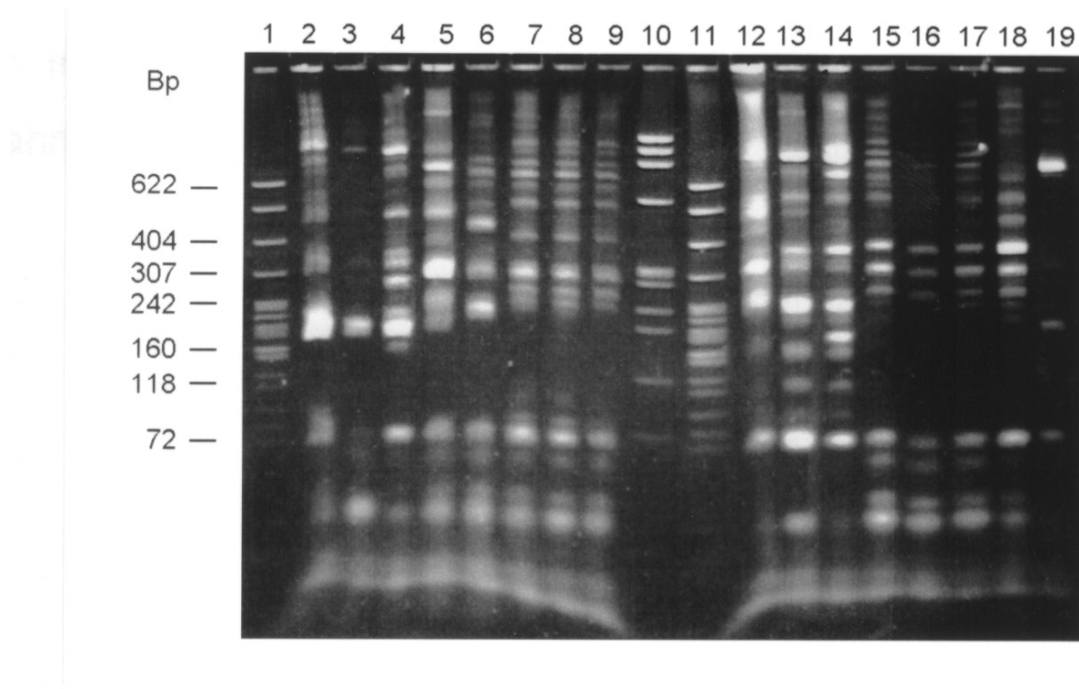
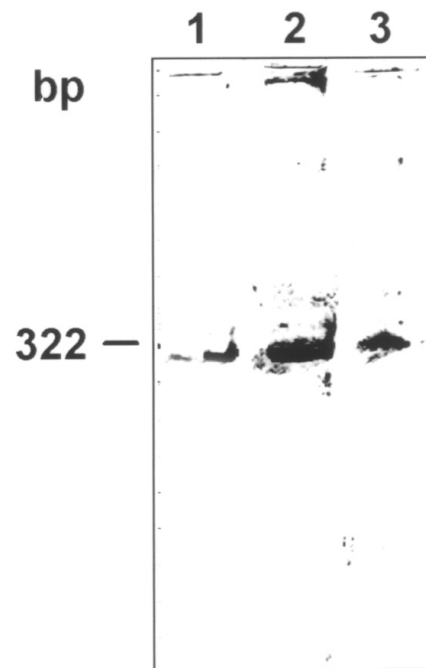


Abb. 35: Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Reaktionen verschiedener *Azoarcus*-Stämme unter Berücksichtigung neuer Isolate. **2**, *Azoarcus* sp. BS2-3; **3**, *A. sp.* 6a2; **4**, *A. sp.* 6a3; **5**, *A. sp.* BS20-3, **6**, *A. sp.* BS1-14; **7**, *A. sp.* SSa3, **8**, *A. sp.* S5b1; **9**, *A. sp.* S5b2; **12**, *A. communis* sp. KGP1; **13**, *A. communis* sp. S2; **14**, *A. communis* sp. SWub3; **15**, *A. indigens* sp. BS2-10; **16**, *A. indigens* sp. VW35a; **17**, *A. indigens* sp. VW34c; **18**, *A. indigens* sp. VB32, **19**, *A. tolulyticus* sp. Td-1; **1**, **10**, pBBR322/*Msp* I; **11**, Φ 174/*Hae* III (Größenstandards). Die Amplifikation erfolgte mit den Primern MS9 und MS10.

Bei der Hybridisierung zeigte mit der oben beschriebenen Intronsonde zeigte ein Fragment des Stammes *Azoarcus* sp. BS20-3 ein spezifisches Signal. Die Größe des Fragmentes konnte auf ca. 300 bp bestimmt werden. Dieses Signal konnte in einer erneuten Hybridisierung reproduziert werden (Abb. 35)

Abb. 35: Southern-Hybridisierung mit amplifizierter DNA von (1) *Azoarcus* sp. BH72, (2) *Aqua-spirillum delicatum* sowie (3) *Azoarcus* sp. BS20-3.

Als Sonde wurde das 251 bp große, mit den Primern MSAQF und MSAQR durch PCR hergestellte Intronfragment aus *Aquaspirillum delicatum* verwendet. Die Hybridisierung erfolgte bei 65°C, zu Posthybrisierungswaschungen siehe 3.7.



Es konnte gezeigt werden, daß es mit der formulierten Intronsonde aus *Aquaspirillum delicatum* möglich ist, neue Intronsequenzen in genomischer DNA verschiedener Stämme nachzuweisen. Weiterhin konnte in dem neuen Isolat *Azoarcus* sp. BS20-3, das aus Sporen von Basidiomyceten in Reisfeldboden isoliert wurde, mit der Intronsonde ein Signal detektiert werden, daß wahrscheinlich auf eine intronhaltige tRNA zurückzuführen ist.

5 DISKUSSION

Die Diskussion beschäftigt sich im Wesentlichen mit der Funktion der tRNA^{Ile} in *Azoarcus* sp. BH72 (5.1) und dem Einfluß des Introns auf die Ausbildung reifer tRNA^{Ile} (5.2). Abschließend wird über die Herkunft und Verbreitung von Introns in Bacteria spekuliert (5.3).

5.1 Die tRNA^{Ile} in *Azoarcus* sp. BH72

- ein funktionelle Nukleinsäure

tRNAs sind ubiquitär in jeder Zelle vorhanden, und ihre funktionale Mitwirkung in der Proteinbiosynthese ist weitreichend bekannt. Sie können aber auch in anderen Stoffwechselvorgängen der Zelle eine Rolle spielen. So sind in *Staphylococcus epidermidis* tRNAs am Transport der Aminosäuren Glycin, Serin und Threonin zum Aufbau der Peptidoglycanschicht der Zellwand beteiligt (Stewart *et al.*, 1971). In der Häm-Biosynthese verschiedener Organismen wie *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis* liefert eine tRNA^{Glu} den Ausgangsbaustein, die Aminosäure Glutamat (Jahn *et al.*, 1992). Die Mitwirkung einer tRNA in *E. coli* konnte als Anzeiger für den Metabolismus-Status der Zelle nachgewiesen werden. Dabei ist die Antitermination des Transkripts *livJ* des hochaffinen Transportsystems für Leucin, Valin und Isoleucin von der Verfügbarkeit der Leucyl-tRNA abhängig (Williamson und Oxender, 1992). In unbeladenem Zustand können tRNAs als Primer für retrovirale Transkription verwendet werden (Kikuchi *et al.*, 1990). tRNA-Gene dienen Phagen, Plasmiden und Retroelementen häufig als Integrationsstelle in das Wirtsgenom verschiedener Bakterien (Reiter *et al.*, 1989). Aus den oben aufgezeigten Aspekten ergibt sich die Frage, ob die hier untersuchte tRNA^{Ile} für Gene des Haushaltsstoffwechsels benötigt wird, nur für die Translation spezieller, differenzierungsspezifischer Transkripte zur Verfügung steht oder eine andere Funktion im Stoffwechsel außerhalb der Proteinbiosynthese einnimmt.

Schon in der Diplomarbeit konnte gezeigt werden, daß es sich bei der tRNA^{Ile} um ein funktionelles Gen handelt, da eine Unterbrechung der *ileX*-Gensequenz im Chromosom von *Azoarcus* sp. BH72 durch eine Resistenzkassette nicht möglich war (Stommel, 1994). In einem nun durchgeführten zweiten Versuch konnte die Mutation durch eine plasmidkodierte Kopie komplementiert und dadurch eine Unterbrechung der

genomischen *ileX*-Kopie möglich gemacht werden. Damit wurde bestätigt, daß es sich um ein essentielles Gen und somit eine funktionelle tRNA^{Ile} handelt, die für das Wachstum von *Azoarcus* sp. BH72 notwendig ist.

tRNA Moleküle sind die am stärksten modifizierten Nukleinsäuren in der Zelle. Die Modifikationen erfolgen bis auf eine Ausnahme posttranskriptionell. Für die untersuchte tRNA^{Ile} aus *Azoarcus* sp. BH72 wird eine Modifikation des Anticodons postuliert, so daß sie in der Proteinbiosynthese das Isoleucin-Codon AUA bedienen kann. Die Modifikation einer tRNA^{Ile} mit CAU-Anticodon ist auch aus anderen Organismen bekannt (Andachi *et al.*, 1989; Weber *et al.*, 1990). So wird die erste Base des Anticodons CAU einer tRNA^{Ile} aus *E. coli*, die aufgrund des Anticodons eigentlich für Methionin codiert, mit einem Lysin zu Lysidin modifiziert, so daß sie das Isoleucin-Codon AUA bedienen kann (Muramatsu *et al.*, 1988). Das AUA-Codon, das diese modifizierte tRNA^{Ile} bedient, wurde in keinem der bisher in *Azoarcus* sp. BH72 sequenzierten Gene, entsprechend ca. 24 kb gefunden. Das Isoleucin-Codon AUA ist generell ein in bakteriellen Transkripten selten vorkommendes Codon (Wada *et al.*, 1992). Aus *E. coli* ist bekannt, daß die tRNA^{Ile} mit CAU-Anticodon (Minor-Form) in einer sehr niedrigen Konzentration vorliegt. Im Verhältnis zu der hauptsächlich in der Zelle vorkommenden tRNA^{Ile} (Major-Form), die die Anticodons AUU und AUC bedient, liegt der Anteil der Minorform bei nur 5% (Harada und Nishimura, 1974). Damit ließe sich auch erklären, daß die entsprechende tRNA^{Ile} nur in geringer Menge in *Azoarcus* sp. BH72 vorkommt (B. Reinhold-Hurek, unveröffentlichte Daten). Da es sich offenbar um eine seltene tRNA handelt, kann sie möglicherweise eine spezielle Funktion für die Zelle besitzen. So existieren einige Beispiele für bakterielle tRNAs, die für die Expression spezieller Gene unter bestimmten Wachstumsbedingungen benötigt werden, da nur dort das entsprechende Codon vorkommt. So ist die Expression von Genen des Sekundärmetabolismus wie Antibiotika-Produktion und die Ausbildung von Myzel und Conidiosporen in *Streptomyces coelicor* von der Anwesenheit des *leuZ*-Genprodukts, einer tRNA^{Leu}, abhängig. Auch die Expression der Gene für heterotrophes oder phototrophes Wachstum in *Rhodobacter capsulatus* (Saier, 1995), die Virulenzeigenschaften in *Shigella flexneri* (Hromockyj *et al.*, 1992), und die Produktion von Lösungsmitteln in *Clostridium acetobutylicum* (Sauer und Dürre, 1992) sind durch die Anwesenheit seltener tRNAs beeinflusst. Da auch *Azoarcus* sp. BH72 differenzierungsspezifische Vorgänge in der Zelle, wie die Ausbildung intrazellulärer Membranen, aufweist, wäre eine Funktion dieser Codons in Bezug auf mögliche, die Differenzierung von *Azoarcus* sp. BH72 betreffende Gene denkbar. Die tRNA^{Ile} wird aber von der Zelle nicht ausschließlich für differenzierungsspezifische Gene benötigt, da durch die oben dargestellten Untersuchungen belegt ist, daß es nicht möglich ist, das Gen bei vegetativem Wachstum unter aeroben Bedingungen zu unterbrechen.

- die Lokalisation im Genom von *Azoarcus* sp. BH72

Die Genorganisation des tRNA^{Ile}-Gens im Genom unterscheidet sich von der Mehrzahl der tRNA-Gene. Im Allgemeinen liegen die tRNA-Gene im bakteriellen Genom als Operone vor. Von den 79 tRNA-Genen in *E. coli* werden nur 20 monocistronisch transkribiert, darunter auch das *ileX*-Gen (Inokuchi und Yamao, 1995). Da eine putative Promotorsequenz vor sowie eine Terminatorsequenz hinter dem tRNA^{Ile}-Gen liegt, läßt sich schließen, daß auch das *ileX*-Gen aus *Azoarcus* sp. BH72 monocistronisch transkribiert wird. Diese Theorie wurde durch die Komplementation der Unterbrechung des *ileX*-Gens untermauert (4.2). Das zur Komplementation verwendete 1,7 kb Fragment aus *Azoarcus* sp. BH72 enthält nur die vollständige Sequenz des *ileX*-Gens einschließlich des putativen Promotorbereiches. Da mit diesem Fragment eine Komplementation des genomisch kodierten *ileX*-Gens möglich war, läßt dies auf ein monocistronisches Transkript schließen.

Auch die umgebende Genorganisation weist darauf hin. Stromabwärts befindet sich in entgegengesetzter Richtung ein Leserahmen, der große Homologien zu dem Gen *gloA* aus *Salmonella typhimurium* (Clugston *et al.*, 1997) aufweist. Das Genprodukt Glyoxalase vermittelt eine Resistenz gegen Methylglyoxal. Stromaufwärts gelegen wurde ein Leserahmen mit starker Homologie zu *rpoD*-Genen gefunden, die für den generellen Sigmafaktor kodieren. Das Genprodukt, der Sigmafaktor σ^{70} , vermittelt der Polymerase die Erkennung und spezifische Bindung an σ^{70} -abhängige Promotoren. Die mit Abstand höchsten Homologien zeigt dieser Sigma-Faktor mit der Sequenz des *rpoD*-Gens aus *Bordetella pertussis*. Dieses humanpathogene

Gram-negative strikt aerobe Bakterium ist der Erreger des hochinfektiösen Keuchhustens. Taxonomisch ist es wie *Azoarcus* sp. BH72 in die β -Gruppe der Proteobakterien einzuordnen. Hinter der Sequenz des *rpoD*-Gen aus *B. pertussis* wurde ein Leserahmen für ein tRNA-Gen gefunden. Er zeigt hohe Homologien zu dem *ileX*-Gen aus *Azoarcus* sp. BH72 und enthält auch die Basen CAT im Anticodonbereich. Allerdings ist in diesem tRNA-Leserahmen kein Intron inseriert. Dies könnte darauf hinweisen, daß diese Genorganisation auch in anderen *Azoarcus*-Stämmen und auch bakteriellen Genera vorliegt.

5.2 Das Intron: ein Parasit gewinnt an Bedeutung ?

Durch die Deletion des Introns der tRNA^{Ile} in *Azoarcus* sp. BH72 sollte der Einfluß des Introns untersucht werden, da Introns eine essentielle Funktion im Reifungsprozeß der sie enthaltenden tRNA haben können.

Untersuchungen zur Funktion von Introns sind bisher nur in Eukarya durchgeführt worden. Introns in eukaryotischen tRNA-Transkripten sind nur wenige Nukleotide groß, in *Saccharomyces cerevisiae* z.B. zwischen 8 und 60 Nukleotide. Sie werden, im Gegensatz zu Gruppe-I Introns in bakteriellen tRNAs, enzymatisch, d.h. unter Hilfe zusätzlicher Enzyme wie Endonuklease, Ligase und Phosphotransferase herausgespleißt. Eine mögliche Funktion eines Introns wurde bei *S. cerevisiae* nachgewiesen (Johnson und Abelson, 1983). Dort liegt in einer tRNA^{Tyr} vor der 1. Base des Anticodons ein 14 Nukleotide großes Intron inseriert vor. Zusätzlich erfordert die korrekte Prozessierung der tRNA die Modifikation einer Anticodon-Base zu Pseudouridin. Offenbar ist die Präsenz des Introns notwendig, um eine effektive enzymatische Modifikation zu ermöglichen, damit eine funktionsfähige tRNA entstehen kann. Der gleiche Effekt konnte auch für die tRNA^{Ile} nachgewiesen werden, deren Anticodon mit zwei Pseudouridinen modifiziert wird (Szweykowska-Kulinska *et al.*, 1994). Auch hier ist das 60 Nukleotide große Intron zur Modifikation des Anticodons und somit zur Reifung der tRNA notwendig. Für eine tRNA^{Phe} konnte in einer *in vitro*-Studie ein pleiotropher Effekt des Introns auf die verschiedenen Modifikationen des Anticodons nachgewiesen werden (Jiang *et al.*, 1997). So ist die Anwesenheit des Introns zur Ausbildung der Basenmodifikation m⁵C₄₀ absolut notwendig. Andere, die Anticodon-Schleife betreffende Basenmodifikationen finden erst statt, wenn das Intron herausgespleißt wurde, und eine dritte Gruppe von Basenmodifikationen findet unabhängig von der Anwesenheit des Introns statt. Hätte das Intron in der *Azoarcus*-tRNA^{Ile} eine ähnliche Funktion, müßte man eine letale bzw. das Wachstum stark beeinflussende Mutation erwarten, da das Gen in nur einer Kopie im Genom vorliegt und die funktionsfähige tRNA, wie in der vorliegenden Arbeit beschrieben, offenbar zum Wachstum benötigt wird.

Die Klonierung des introndeletierten tRNA^{Ile}-Gens über mehrere Klonierungsschritte in ein Plasmid, das genügend flankierende Sequenz bot, um Rekombination in *Azoarcus* sp. BH72 zu gewährleisten, war in *E. coli* erfolgreich durchgeführt worden (Stommel, 1994). Auch die Transformation, bei der das Plasmid durch homologe Rekombination ins Genom integrieren sollte, konnte erfolgreich durchgeführt werden, nachdem die Ampicillin-Konzentration zur Selektion auf mögliche Transformanten gesenkt worden war. Über zwei nacheinander erfolgte Rekombinationsereignisse war es möglich, Mutanten zu erhalten, die das ursprüngliche intronhaltige Gen gegen die intronlose Kopie ausgetauscht hatten. Damit konnte nachgewiesen werden, daß der Austausch prinzipiell möglich war und das Intron keine essentielle Funktion für die Reifung der tRNA und somit das Wachstum von *Azoarcus* sp. BH72 hat.

Die Zellen der intronlosen Mutante BHDRDI unterschieden sich phänotypisch wie z.B. durch Kolonieform

und Farbe nicht vom Wildtyp *Azoarcus* sp. BH72. Eine durchgeführte Analyse des 5'-Bereichs des Transkripts mit RNA-Extrakten von Wildtyp und intronloser Mutante und speziellen Primern, mit denen zwischen intronhaltigem und intronlosem Transkript differenziert werden konnte, zeigte keinen Unterschied im 5'-Bereich des tRNA^{Ile}-Transkripts. Dies läßt darauf schließen, daß die Prozessierung des 5'-Bereiches nicht durch die An- bzw. Abwesenheit des Introns beeinflusst wird. Im direkten Wachstumsvergleich mit dem Wildtyp *Azoarcus* sp. BH72 konnte bei der intronlosen Mutante unter verschiedenen Wachstumsbedingungen jedoch einen signifikanten Wachstumsnachteil beobachtet werden. So zeigte die Mutante im Wachstum unter aeroben Bedingungen eine erhöhte Generationszeit um ca. 10 %. Dieser Effekt der Introndeletion wurde aber erst in einem großen Wachstumszeitraum von 25-30 Generationen signifikant meßbar, wie in den vorgestellten Untersuchungen gezeigt werden konnte. Der Wachstumsnachteil trat unter aeroben sowie stickstofffixierenden Wachstumsbedingungen auf. Unter mikraeroben Bedingungen mit Kaliumnitrat als Stickstoffquelle wurde der Effekt nicht sichtbar. Dies läßt vermuten, daß die tRNA unter aeroben und stickstofffixierenden Bedingungen in besonderem Maße benötigt wird. Ein Defizit reifer tRNA^{Ile} durch unvollständige Modifikation könnte zur verminderten Synthese wichtiger Proteine unter diesen Wachstumsbedingungen führen. Da diese Deletion aber nicht letal für *Azoarcus* sp. BH72 ist, müßte trotzdem genug funktionelle tRNA^{Ile} vorliegen, um den lebensnotwendigen Bedarf der Zelle abzudecken. Ob es sich dabei um eine andere tRNA handelt, die die AUA-Codons am Ribosom bedient, die unvollständig modifizierte tRNA^{Ile} oder ob noch genug modifizierte tRNA^{Ile} gebildet werden kann, müßte noch eingehender untersucht werden.

Durch die Komplementation der intronlosen Mutante mit intronhaltiger tRNA^{Ile} konnte nachgewiesen werden, daß der beobachtete Phänotyp auf die Deletion des Introns zurückzuführen ist und nicht durch eine andere parallel vorliegende genomische Mutation verursacht wurde. Der Wildtyp *Azoarcus* sp. BH72, der zum Vergleich auch ein zweites tRNA^{Ile}-Gen im Genom trug, zeigte mit zwei intakten Genkopien jedoch ein schlechteres Wachstum im Vergleich zu der komplementierten Mutante. Dieser Effekt beruht vermutlich auf einem Kopieneffekt durch die zweite Genkopie. Da die tRNA^{Ile} in einer sehr niedrigen Konzentration in der Zelle vorliegt, beeinflußt eine Verdopplung des Transkripts und somit des Genprodukts das Zellwachstum möglicherweise negativ.

Um in der intronlosen Mutante die Verfügbarkeit funktioneller tRNA in der Translation zu untersuchen, wurden Reportergenstudien durchgeführt. Das Reportergen *uidA*, welches für das Enzym β -Glucuronidase kodiert, enthält natürlicherweise drei ATA-Codons für die Aminosäure Isoleucin. Durch Translation dieses Genes im Wildtyp sowie der introndeletierten Mutante sollte ein erhöhter Bedarf des ATA-Codon simuliert werden, um einen eventuellen tRNA^{Ile}-Mangel in der intronlosen Mutante nachzuweisen. Es trat allerdings kein Unterschied in den quantitativen Messungen des umgesetzten Substrats auf. Dies läßt darauf schließen, daß trotz des mehrfach auftretenden Codons ATA ausreichend tRNA zur Synthese der β -Glucuronidase zur Verfügung stand. Die ATA Codons liegen in dem *uidA*-Gen allerdings weit voneinander entfernt; ein Konstrukt, in dem mehrere ATA-Codons direkt hintereinanderliegen, könnte durch einen konzentrierten Bedarf der tRNA^{Ile} am Ribosom und einem eventuellen Abbruch der Translation einen Unterschied zum Wildtyp sichtbar machen.

Eine weitere, durch die Introndeletion verursachte Veränderung zeigte sich im spätstationären Wachstum der introndeletierten Mutante. Die dort beobachteten Zellaggregate konnten mit speziellen Fluoreszenzfarbstoffen mikroskopisch als heterogen charakterisiert werden, und bestanden zumeist aus abgestorbenen Bakterienzellen. Zum Teil konnten auch heterogene Aggregate beobachtet werden, die sich aus lebenden und abgestorbenen Zellen zusammensetzten. Dies könnte darauf hinweisen, daß es verschiedene Stadien der Aggregatzusammensetzung mit abgestorbenen Zellen als Endstadium gibt. Die Aggregatbildung, die auch beim Wildtyp, dort jedoch erst zu einem viel späteren Zeitpunkt stattfindet, könnte z.B. auf fehlende Proteine hinweisen, die die Zelle oder einzelne Zellstrukturen stabilisieren und so vor Abbau schützen. In der zweidimensionalen Auftrennung von Gesamtprotein-Extrakten konnten allerdings keine Proteine nachgewiesen werden, die im Vergleich von *Azoarcus* sp. BH72 zu der introndeletierten Mutante wegfielen oder stark abnahmen. Alternativ könnten durch die Introndeletion direkt Proteine betroffen sein, die dadurch eine geringere Stabilität aufweisen und früher abgebaut werden. So konnte in zellfreien Extrakten von *E. coli* beobachtet werden, daß bestimmte Transferasen die Aminosäuren Leucin und Phenylalanin von ihren

jeweiligen tRNA-Molekülen auf das aminoterminal Ende bestimmter Proteine übertragen, die so stabilisiert werden (Leibowitz und Soffer, 1969).

Die Introndeletion könnte aber auch direkt in einen regulatorischen Prozeß eingreifen, der durch die Anwesenheit des Introns im Transkript selbst die Ausbildung funktioneller tRNA limitiert. Der Spleißprozeß von Gruppe I Introns kann außerdem von weiteren Proteinen beeinflusst werden. So ist aus *E. coli* und *Neurospora crassa* bekannt, daß Maturasen und tRNA-Synthetasen das Spleißen von Gruppe I-Introns fördern können, in dem sie die korrekte Faltung der Intron-RNA erleichtern (Dujardin und Herbert, 1996). Ähnliche Proteine könnten durch ihre, das Spleißen begünstigende Funktion einen regulatorischen Schritt der tRNA-Reifung darstellen. So könnte in *Azoarcus* sp. BH72 die Konzentration dieser seltenen tRNA^{Ile} niedrig gehalten werden. Ein Wegfall dieser Regulation könnte zu einem Übermaß funktioneller tRNA führen, was sich, vergleichbar mit einem Gendosisseffekt, negativ auf die Zelle auswirken könnte.

Im natürlichen Habitat von *Azoarcus* sp. BH72, der Rhizosphäre von Pflanzen, können die Bakterien unter Substratüberschuß und optimalen Bedingungen hohe Wachstumsraten erreichen. Ein Verlust des Introns unter diesen Konditionen würde zu einem starken Wachstumsnachteil und in Konkurrenz zum Wildtyp zu einem Verdrängen der Population führen. Durch die dem Intron zugeordnete Funktion ist ein Verlust unter *in vivo* Bedingungen daher sehr unwahrscheinlich.

Durch die Deletion des Introns in der tRNA^{Ile} von *Azoarcus* sp. BH72 konnte gezeigt werden, daß dem Intron eine Funktion in der Zelle zukommt. Ob diese Funktion ursprünglich war oder aber aus einem "parasitierenden genetischen Element" im Laufe der Evolution von *Azoarcus* sp. BH72 ein regulatorisches Element wurde, kann allerdings nicht endgültig entschieden werden.

5.3 Ursprünglichkeit oder Neuerwerb: Die Verbreitung von Gruppe I Introns in Bacteria

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein neues Intron nachgewiesen werden, daß als selbstspleißendes Intron der Gruppe I charakterisiert werden konnte.

Introns waren zuerst nur aus Eucarya und Archaea bekannt. Ihre Entdeckung in Cyanobakterien (Xu *et al.*, 1990; Kuhsel *et al.*, 1990) widerlegte das Dogma, daß Introns spätere evolutionären Ursprungs sind und daher nicht in Bacteria vorkommen. Die Existenz von Gruppe I Introns in voneinander systematisch verschiedenen eubakteriellen Organismen sowie Mitochondrien und Chloroplasten weist stark auf die Theorie hin, daß bestimmte Intronformen schon im Progenoten von Archaea, Eukarya und Bacteria vorhanden waren (Cavalier-Smith, 1991; Shub, 1991). Die Fähigkeit von Gruppe I und II Introns, sich autokatalytisch herauszuspleißen, könnte auf die Möglichkeit hindeuten, daß diese Introns schon in der propagierten präzellulären RNA-Welt existierten (Gilbert, 1986). Dabei könnte die beobachtete diskontinuierliche Verbreitung von Introns durch einen vielfachen Verlust in mehreren Linien der Evolution erklärt werden (Darnell und Dolittle, 1986). Ein weiterer Hinweis auf ein ursprüngliches Vorkommen von Gruppe I Introns konnte in cyanobakteriellen tRNA-Genen beobachtet werden. Ein in eine tRNA^{Leu} inseriertes Gruppe I Intron konnte in mehreren Stämmen von Cyanobakterien, aber auch in Plastiden nachgewiesen werden. Da Plastiden aus endosymbiontischen Cyanobakterien entstanden sind, läßt diese Beobachtung auf einen gemeinsamen Vorläufer schließen. Alternativ könnten sich Introns aber auch erst neuzeitlich in ursprünglich intakte Gene inseriert haben. Dafür spricht ihre Mobilität und die nachgewiesene Fähigkeit zur Transposition sowie horizontaler Gentransfer (Palmer und Logsdon, 1991).

Da das Auffinden weiterer Introns in Bacteria nicht nur zur Klärung möglicher Funktionen beitragen könnte, sondern auch von evolutionärem Interesse wäre, wurde ein Primersystem entwickelt, um gezielt Introns in tRNA^{Ile}-Genen nachzuweisen. Damit gelang, es ein weiteres, 264 Nukleotide großes Intron in *Aquaspirillum delicatum* nachzuweisen. Es war auch hier in einem tRNA^{Ile}-Gen mit CAU-Anticodon inseriert und konnte als selbstspleißendes Intron der Gruppe I charakterisiert werden. *A. delicatum* ist ein spirillenförmiges, Gram-negatives Bakterium und gehört auf der Basis von 16S rRNA-Vergleichen zur rRNA-Superfamily III

(korrespondierend zur β -Gruppe der Proteobakterien), mit Ähnlichkeiten zu den Genera *Comamonas* und *Pseudomonas* (Pot *et al.*, 1991). Da auch *Azoarcus* sp. BH72 in die rRNA-Superfamily III eingestuft wurde (Reinhold-Hurek *et al.*, 1993a) und das Intron in einer tRNA^{Leu} inseriert vorliegt, könnte man erwarten, daß beide Introns starke Homologien zueinander aufweisen. Erste Vergleiche auch zu anderen bakteriellen Gruppe I Introns aus *Agrobacterium tumefaciens* und *Anacystis nidulans* zeigten Ähnlichkeiten in konservierten Bereichen der Sequenz, die das Intron aus *Aquaspirillum delicatum* als der Gruppe I zugeordnet bestätigten. Führt man eine phylogenetische Analyse mit verschiedenen in bakteriellen und eukaryontischen Genen inserierten Gruppe I Introns durch (Abb. 36), so läßt sich das Intron aus *A. delicatum* aufgrund identitätstragender Sequenzbereiche phylogenetisch eher den eukaryotischen Gruppe I Introns zuordnen, jedoch keiner der bisher bekannten Untergruppen. Introns dieser Untergruppen sind bisher nur aus ribosomalen Genen in Kern, Chloroplasten oder Mitochondrien von Pilzen, Amöben, Pflanzen und Phagen nachgewiesen worden.

Betrachtet man diese phylogenetische Einstufung, so läßt sich vermuten, daß es sich bei dem in *A. delicatum* inserierten Intron um einen neuzeitlichen Erwerb handelt, der vermutlich über lateralen Gentransfer in das Genom übertragen wurde. Das zeigt auch die in der phylogenetischen Analyse aufgetretene Distanz zu den anderen bakteriellen, in tRNA Genen inserierten Introns, in der diese stärkere Homologien zueinander aufweisen. Es könnte sich aber auch um eine sehr ursprüngliche Intronform handeln, die schon im Progenoten vorhanden war, und somit einen Vorläufer eukaryontischer Introns darstellt.

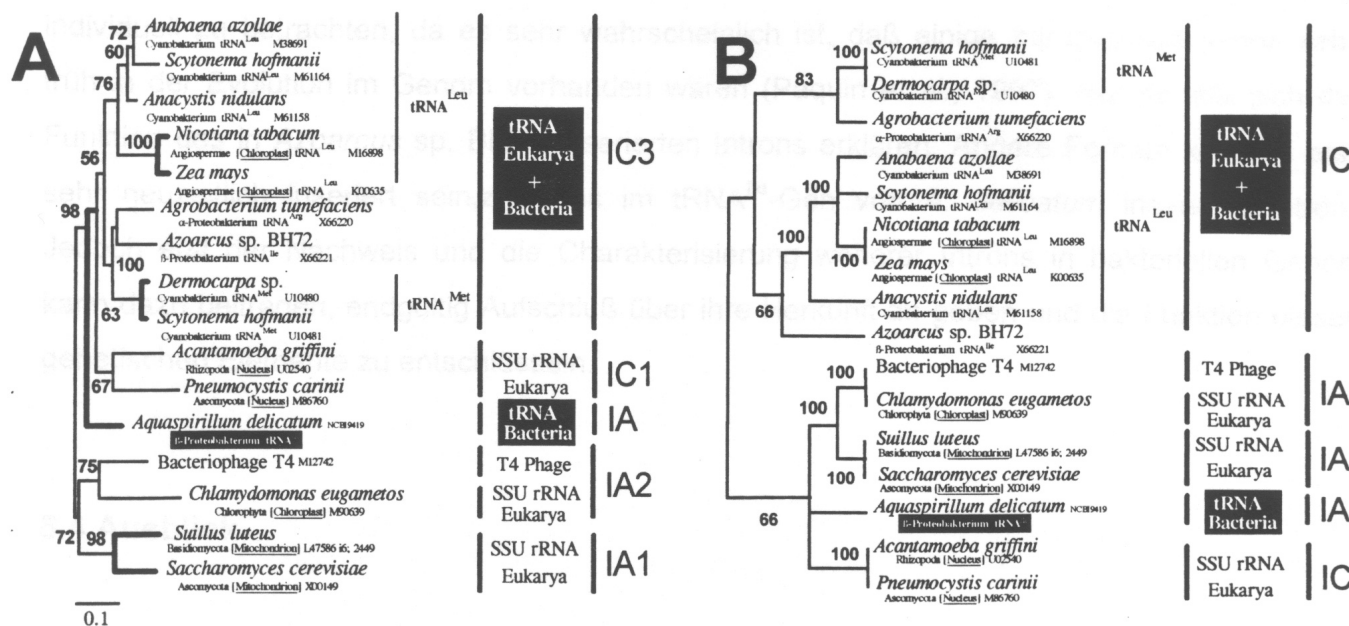


Abb.36: Phylogenetische Analyse verschiedener bakterieller und eukaryotischer Introns der Gruppe I auf der Basis von Intron-Core-Sequenzen.

(A) Neighbor-joining-Phenogramm. Benutzte Vertrauensbereiche größer 50 % sind an der Verzweigung angegeben. (B) Maximum Parsimony Cladogramm berechnet nach dem Branch and Bound-Algorithmus (Majority rule Konsensus). Accession-Nummern verwendeter Sequenzen stehen hinter dem Artnamen (Phylogenetische Analyse durch T. Hurek).

Mit einer speziell entwickelten Intron-Sonde konnte ein spezifisches Signal erhalten werden, welches auf ein weiteres Intron in einem *Azoarcus*-Stamm hinweist, der aus Basidiomyceten-Sklerotien isoliert wurde. Betrachtet man die Gesamtheit der untersuchten Stämme, so konnten bisher aus 18 *Azoarcus*-Stämmen zwei Introns aus tRNA^{Leu}-Genen nachgewiesen werden (siehe 4.10.1). Dies läßt darauf schließen, daß nicht alle *Azoarcus*-Stämme ein intronhaltiges tRNA^{Leu}-Gen haben. Dieses Verteilungsmuster läßt sich wahrscheinlich

Untersuchungen zur Funktion und Verbreitung

auch auf die Verbreitung von Gruppe I Introns in tRNA^{Ile}-Genen anderer Genera der Proteobakterien übertragen, da z.B. auch die tRNA^{Ile}-Gene mit CAU-Anticodon aus *E. coli*, *Mycoplasma capricolum* und auch *Bordetella pertussis* kein Intron inseriert haben. Diese Intronform lag vermutlich ursprünglich in tRNA^{Ile}-Genen verschiedener Evolutionslinien verbreitet vor, und die meisten Introns sind aufgrund evolutionärer Rationalisierung als "nutzloser Ballast" verloren gegangen. Sie wurden möglicherweise nur dann beibehalten, wenn die Introns eine Funktion entwickelt hatten, die für das Wachstum bzw. den Stoffwechselweg unter bestimmten Bedingungen notwendig waren, um der Konkurrenz standzuhalten oder gar überlegen zu sein. Eine solche, das Wachstum beeinflussende Funktion konnte für das Gruppe I Intron aus *Azoarcus* sp. BH72 nachgewiesen werden.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß keine generelle Aussage über die Ursprünglichkeit oder Neuerwerbung von Introns in Bacteria möglich ist. Vielmehr ist die Fragestellung individuell zu betrachten, da es sehr wahrscheinlich ist, daß einige Intronformen schon sehr früh in der Evolution im Genom vorhanden waren (Paquin *et al.*, 1997). Nur so läßt sich die Funktion des in *Azoarcus* sp. BH72 inserierten Introns erklären. Andere Formen könnten erst sehr neuzeitlich inseriert sein, z.B. das im tRNA^{Ile}-Gen von *A. delicatum* inserierte Intron. Jedoch erst der Nachweis und die Charakterisierung weiterer Introns in bakteriellen Genen kann dazu beitragen, endgültig Aufschluß über ihre Herkunft zu geben und die Funktion dieser genetischen Elemente zu entschlüsseln.

5.4 Ausblick

Für die Zukunft sind Versuche zur Charakterisierung der Modifikation des Anticodons der tRNA^{Ile} aus *Azoarcus* sp. BH72 geplant, da Modifikationen des Anticodons der tRNA^{Ile}_{minor}-Form schon aus mehreren bakteriellen Organismen bekannt ist. Daran anschließend könnten Funktionsstudien zum Einfluß des Introns in der Ausbildung der funktionellen tRNA^{Ile} durchgeführt werden.

Die Übertragung von *in vitro* spleißing-defekten bzw. behinderten Mutanten auf *in vivo* Bedingungen durch Einbringen in das Genom, könnte Aufschluß darüber geben, ob und wie sich dieser Defekt auf das Wachstum von *Azoarcus* sp. BH72 auswirkt.

In Northern-Blot-Analysen könnte die Menge reifer sowie noch unprozessiert vorliegender tRNA unter verschiedenen Stoffwechselbedingungen quantifiziert werden. Dies könnte Hinweise auf einen unter besonderen physiologischen Bedingungen bestehende Bereitstellung von tRNA^{Ile} geben.

Durch Promotorfusionsstudien können Rückschlüsse auf eine mögliche Induktion des Gens unter speziellen Bedingungen gezogen sowie Aussagen über einen möglichen Regulationsmechanismus getroffen werden.

Abschließend könnten Nachweis und Charakterisierung neuer Introns aus verschiedenen bakteriellen Genera Hinweise auf die Herkunft und Verbreitung der verschiedenen Intronformen in Bacteria geben und so vielleicht auch ihre Funktion weiter aufklären.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers und D. J. Lipman.

1990. Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. **215**:403-410.

Andachi, Y., Y. Fumiaji, A. Muto und S. Osawa.

1989. Codon recognition pattern as deduced from sequences of the complete set of transfer RNA species in *Mycoplasma capricolum*. J. Mol. Biol. **209**:37-45.

Anders, H.-J., A. Kaetzke, P. Kämpfer, W. Ludwig und G. Fuchs.

1995. Taxonomic position of aromatic-degrading denitrifying Pseudomonad strains K172 and KB740 and their description as new members of the genera *Thauera*, as *Thauera aromatica* sp. nov., and *Azoarcus*, as *Azoarcus evansii* sp. nov., respectively, members of the beta subclass of the Proteobacteria. Int. J. Syst. Bacteriol. **45**:327-333.

Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith und K. Struhl (Hrsg.).

1987. Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, New York, USA.

Bechhofer, D. H., K. Hue und D. A. Shub.

1994. An intron in the thymidylate synthase gene of *Bacillus* bacteriophage β 22: evidence for independent evolution of a gene, its group I intron, and the intron open reading frame. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91**:11669-11673.

Belfort, M. und R. J. Roberts.

1997. Homing endonucleases: keeping the house in order. Nucl. Acids Res. **25(17)**:3379-3388.

Biniszkiewicz, D., E. Cesnaviciene und D. A. Shub.

1994. Self-splicing group I intron in cyanobacterial initiator methionine tRNA: Evidence for lateral transfer of introns in bacteria. EMBO J. **13(19)**:4629-4635.

Birnboim, H. C. und J. Doly.

1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant DNA. Nucl. Acids Res. **7**:1513-1523.

Blum, H., H. Beier und H. J. Gross.

1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. Electrophoresis, Vol. **8**: 93-99.

Cavalier-Smith, T.

1991. Intron phylogeny: a new hypothesis. TIG **7(5)**:145-148.

Cech, T.R.

1990. Self-splicing of group I introns. Annu. Rev. Biochem. **59**:543-568.

Chu, F. K., G. F. Maley, F. Maley und M. Belfort.

Untersuchungen zur Funktion und Verbreitung

1984. Intervening sequence in thymidylate synthase gene of bacteriophage T4. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**:3049-3053.

Clugston S. L., E. Daub, R. Kinach, D. Miedema, J. F. Barnard, und J. F. Honek.

1997. Isolation and sequencing of a gene coding for glyoxalase I activity from *Salmonella typhimurium* and comparison with other glyoxalase I sequences. Gene **186**(1):103-111.

Crain P. F. and J. A. McCloskey.

1997. The RNA modification database. Nucl. Acids Res. **25**(1): 126-127.

Darnell, J. E. und W. F. Doolittle.

1986. Speculations on the early course of evolution. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**:1271-1275.

Dhaese, P., H. De Greve, H. Decraemer, J. Schell und M. Van Montagu.

1979. Rapid mapping of transposon insertion and deletion mutations in the large Ti-plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*. Nucl. Acis Res. **7**:1837-1849.

Doolittle, W. F.

1991. The origin of introns. Current Biology **1**:145-146.

Dujardin G. und C. J. Herbert.

1996. Aminoacyl tRNA synthetases involved in group I intron splicing. In Rachel Green und Renée Schroeder (Hrsg.), Ribosomal RNA and group I introns. Springer Verlag, Heidelberg, Deutschland.

Ferat J.-L. und F. Michel.

1993. Group II self-splicing introns in bacteria. Nature **364**:358-361.

Fries, M. R., J. Zhou, J. C. Chee-Sanford und M. J. Tiedje.

1994. Isolation, characterization and distribution of denitrifying toluene degraders from a variety of habitats. Appl. Environ. Microbiol. **60**: 2802-2810.

Gilbert, W.

1986. The RNA world. Nature **319**:618.

Goodrich-Blair, H., V. Scarlato, J. M. Gott, M.-Q. Xu und D. A. Shub.

1990. A self-splicing group I intron in the DNA polymerase gene of *Bacillus subtilis* bacteriophage SPO1. Cell **63**:417-424.

Goodrich-Blair, H. und D. Shub.

1994. Beyond homing: Competition between intron endonucleases confers a selective advantage on flanking genetic markers. Cell **84**:211-221.

Görg, A., W. Postel und S. Günther

- . 1988. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* **9(9)**: 531-546.
- Gosh, P. K., P. Roy, A. Barkan, J. E. Mertz, S. M. Weissman und P. Lebowitz.
1981. Unspliced functional late 19S mRNAs containing intervening sequences are produced by a late leader mutant of simian virus 40. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **78(3)**:1386-1390.
- Gott, J. M., D. A. Shub und M. Belfort.
1986. Multiple self-splicing introns in bacteriophage T4: evidence from autocatalytic GTP labeling of RNA *in vitro*. *Cell* **47**:81-87.
- Hagervall, T. G, J. U. Ericson, K. B. Esberg, J. N. Li und G. R. Bjork.
1990. Role of tRNA modification in translational fidelity. *Biochim. Biophys. Acta* **1050(1-3)**:263-266.
- Hall, D. H., Y. Liu und D. A. Shub.
1989. Exon shuffling by recombination between self-splicing introns of bacteriophage T4. *Nature* **340**:574-576.
- Hanahan, D.
1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**:557-580.
- Harada, F. und S. Nishimura.
1974. Purification and characterization for AUA specific isoleucine transfer ribonucleic acid from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **13**:300-306.
- Higgins, D. G. and P. M. Sharp.
1989. Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. *CABIOS* **5(2)**:151-153.
- Hromockyj, A. E., S. C. Tucker und A. T. Maurelli.
1992. Temperature regulation of *shigella* virulence identification of the repressor gene *virr* an analogue of *hns* and partial complementation by tyrosyl transfer RNA tRNA-1-Tyr. *Mol. Microbiol.* **6(15)**:2113-2124.
- Hurek, T., B. Reinhold, I. Fendrik und E.-G. Niemann.
1987. Root-zone-specific oxygen tolerance of *Azospirillum* spp. and diazotrophic rods closely associated with Kallar grass. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:163-169.
- Hurek, T. und W. Villiger.
1992. Improved histochemical detection of GUS reporter gene expression by light microscopy. *Methods Mol. Cell. Biol.* **3**:280-281.
- Hurek, T., S. Burggraf, C. R. Woese und B. Reinhold-Hurek.
1993. 16S rRNA-targeted polymerase chain reaction and oligonucleotide hybridization to screen for *Azoarcus* spp., grass-associated diazotrophs. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:3816-3824.

Untersuchungen zur Funktion und Verbreitung

Hurek, T., B. Reinhold-Hurek, G. K. Turner und F. J. Bergersen.

1994a. Augmented rates of respiration and efficient nitrogen fixation at nanomolar concentrations of dissolved O₂ in hyperinduced *Azoarcus* sp. strain BH72. *J. Bacteriol.* **176**:4726-4733.

Hurek, T., B. Reinhold-Hurek, M. Van Montagu und E. Kellenberger

. 1994b. Root colonization and systemic spreading of *Azoarcus* sp. strain BH72 in grasses. *J. Bacteriol.* **176**:1913-1923.

Hurek, T. und B. Reinhold-Hurek.

1995a. Identification of grass-associated and toluene-degrading diazotrophs, *Azoarcus* spp., by analysis of partial 16s ribosomal DNA sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**(6):2257-2261.

Hurek, T., M. Van Montagu, E. Kellenberger und B. Reinhold-Hurek.

1995b. Induction of complex intracytoplasmic membranes related to nitrogen fixation in *Azoarcus* sp, BH72. *Molecular Microbiology* **18**(2):225-236.

Hurek, T., B. Wagner und B. Reinhold-Hurek.

1997. Identification of N₂-fixing plant and fungus-associated *Azoarcus* species by PCR-based genomic fingerprints. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**(11):4331-4339.

Jahn, D., E. Verkamp und D. Söll.

1992. Glutamyl-transfer RNA: A precursor of heme and chlorophyll biosynthesis. *Trends Biochem. Sci.* **17**:215-218.

Inokuchi, H. und F. Yamao.

1995. Structure and expression of procaryotic tRNA genes, S. 17-30. *In* D. Söll und U. RajBhandary (Hrsg.), tRNA: Structure, biosynthesis and function. American Society for Microbiology, Washington DC, USA.

Jefferson R. A., S. M. Burgess und D. Hirsh.

1986. β -Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *PNAS* **83**:8447-8451.

Jiang H. Q., Y. Motorin, Y.-X. Jin und H. Grosjean.

1997. Pleiotropic effects of intron removal on base modification pattern of yeast tRNA^{Phe}: an *in vitro* study. *Nucleic Acid Res.* **25**:2694-2701.

Johnson, P. F. und J. Abelson.

1983. The yeast tRNA^{Tyr} gene intron is essential for correct modification of its tRNA product. *Nature* **302**:681-687.

Karg, T..

1996. Die Diazosomenbildung in *Azoarcus* sp. BH72: Untersuchung der differentiellen Proteinmuster in der zweidimensionalen Gelelektrophorese und Charakterisierung beteiligter Gene. Dissertation. Philipps-Universität Marburg

Untersuchungen zur Funktion und Verbreitung

Karg, T. und B. Reinhold-Hurek.

1996. Global changes in protein composition of N₂-fixing *Azoarcus* sp. BH72 upon diazosome formation. J. Bacteriol. **178**:5748-5754.

Kersanach, R., H. Brinkmann, M.-F. Liaud, D.-X. Zhang, W. Martin und R. Cerff.

1994. Five identical intron positions in ancient duplicated genes of eubacterial origin. Nature **367**:387-389.

Khan, M. D.

1966. Kallar grass , a suitable grass for saline lands. Agric. Pak. **17**:375.

Kikuchi, Y., M. Sasaki und Y. Anod-Yamagami.

1990. Cleavage of tRNA within the mature tRNA sequence by the catalytic RNA of RNase P: Implication for the formation of the primer tRNA fragment for reverse transcription in *copia* retrovirus-like particles. Proc. Natl. Acad. Sci. **87**:8105-8109.

Knoop, V. und A. Brennicke.

1994. Evidence for a group II intron in *Escherichia coli* inserted into a highly conserved reading frame associated with mobile DNA sequences. Nucl. Acids Res. **22**(7):1167-1171.

Kovach M. E., P. H. Elzer, D. S. Hill, G. T. Robertson, M. A. Farris, R. M. Roop, und K. M. Peterson.

1995. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. Gene **166**:175-176.

Kuhse, M. G., R. Strickland und J. Palmer.

1990. An ancient group I intron shared by eubacteria and chloroplasts. Science **250**:1570-1573.

Kushner, S. R..

1978. An improved method for transformation of *Escherichia coli* with ColEI derived plasmids, S. 17-23. In H. W. Boyer und S. Nicosia (Hrsg.), Genetic engineering. Elsevier/Northern Holland, Niederlande.

Laemmli, U. K.

.1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**:680-685.

Laguerre, G., B. Bossard und R. Bardin.

1987. Free-living dinitrogen-fixing bacteria isolated from petroleum refinery oily sludge. Appl. Environ. Microbiol. **53**:1674-1678.

Leibowitz, M. J. und R. L. Soffer.

1969. A soluble enzyme from *Escherichia coli* which catalyzes the transfer of leucine and phenylalanine from tRNA to acceptor proteins. Biochem. Biophys. Res. Commun. **36**:47-53.

Leski, B. K., M. J. Bibb und K. F. Chater.

Untersuchungen zur Funktion und Verbreitung

1991. The use of a rare codon specifically during development. *Mol. Microbiol.* **5(12)**:2861-2867.

Lewin, B.

1997. *Genes VI*. Oxford University Press, New York, USA.

Lykke-Andersen, J., C. Aagaard, M. Semionkov und R. A. Garrett.

1997. Archaeal introns: splicing, intercellular mobility and evolution. *TIBS* **22**:326-331.

Muramatsu T., K. Nishikawa, F. Nemoto, Y. Kuchino, S. Nishimura, T. Miyazawa und S. Yokoyama.

1988. Codon and amino-acid specificities of a transfer RNA are both converted by a single post-transcriptional modification. *Nature* **336(10)**: 179-181.

Nureki, O., T. Niimi, T. Muramatsu, H. Kanno, T. Kohno, C. Florentz, R. Giege und S. Yokoyama.

1994. Molecular recognition of the identity-determinant set of isoleucine transfer RNA from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **236**:710-724.

O'Farrell P. H..

1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250(10)**:4007-4021.

Palmer, J. D. und J. M. Logsdon.

1991. The recent origin of introns. *Curr. Gen.* **1**:470-477.

Paquin, B. S. D., Kathe, S. A. Nierzwicki-Bauer und D. A. Shub.

1997. Origin and evolution of group I introns in cyanobacterial tRNA genes. *J. Bac.* **179(21)**:6798-6806.

Persson, B. C.

1993. Modification of tRNA as a regulatory device. *Mol. Microbiol.* **8(6)**:1011-1016.

Pot, B., M. Gillis und J. De Ley.

1991. The Genus *Aquaspirillum*. In A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder und K.-H. Schleifer (Hrsg.). *The Prokaryotes III*, 2. Aufl., Springer Verlag, New-York, USA.

Reinhold, B., T. Hurek und I. Fendrik.

1985. Strain specific chemotaxis of *Azospirillum* ssp.. *J. Bacteriol.* **162**: 190-195.

Reinhold, B., T. Hurek, E.-G. Niemann und I. Fendrik.

1986. Close association of *Azospirillum* and diazotrophic rods with different root zones of Kallar grass. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**:520-526.

Reinhold-Hurek, B. und D. A. Shub.

1992. Self-splicing introns in tRNA genes of widely divergent bacteria. *Nature* **357**:173-176.

Untersuchungen zur Funktion und Verbreitung

Reinhold-Hurek, B., T. Hurek, M. Gillis, B. Hoste, M. Vancanneyt, K. Kersters und J. De Ley.

1993a. *Azoarcus* gen. nov., nitrogen-fixing Proteobacteria associated with roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth), and description of two species, *Azoarcus indigens* sp. nov. and *Azoarcus communis* sp. nov.. Int. J. Syst. Bacteriol. **43**:574-584.

Reinhold-Hurek, B., T. Hurek, M. Claeysens und M. van Montagu.

1993b. Cloning, expression in *Escherichia coli* and characterization of cellulolytic enzymes of *Azoarcus* sp., a root-invading diazotroph. J. Bacteriol. **175**:7056-7065.

Reiter, W. D., P. Palm und S. Yeats.

1989. Transfer RNA genes frequently serve as integration sites for prokaryotic genetic elements. Nucl. Acids Res. **17**:1907-1914.

Rosenberg, A. H. und M. L. Gefter.

1969. An iron-dependent modification of several transfer RNA species in *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. **46**:581-584.

Saier, M. H. Jr.

1995. Differential codon usage: A safeguard against inappropriate expression of specialized genes? FEBS Letters **362**(1):1-4.

Sambrook, J., E. F. Fritsch und T. Maniatis.

1989. Molecular Cloning: a laboratory manual. 2. Auflage. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

Sandhu, G. R. und K. A. Malik.

1975. Plant succession - a key to the utilization of saline soils. Nucleus (Karachi) **12**:35-38.

Sandhu, G. R., Z. Aslam, M. Salim, A. Sattar, R. H. Quereshi, N. Ahamad und R. G. Wyn Jones.

1981. The effect of salinity on the yield and composition of *Diplachne fusca* (Kallar grass). Plant Cell Environ. **4**:177-181.

Sanger, F., S. Nicklen und A. R. Coulson.

1977. DNA-sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**:5463-5467.

Sauer, U. und P. Dürre.

1992. Possible function of tRNA^{Thr} ACG in regulation of solvent formation in *clostridium acetobutylicum*. FEMS Microbiol. Letters **100**(1-3):147-153.

Schneider, A., K. P. McNally und N. Agabian.

1994. Nuclear-encoded mitochondrial tRNAs of *trypanosoma brucei* have a modified cytidine in the anticodon loop. Nucl. Acids Res. **22**(18):3699-3705.

Untersuchungen zur Funktion und Verbreitung

Senger, B., S. Auxilien, U. Englisch, F. Cramer und F. Fasiolo.

1997. The modified wobble base inosine in yeast tRNA^{Ile} is a positive determinant for aminoacylation by isoleucyl-tRNA synthetase. *Biochemistry* **36**:8269-8275.

Shub, D. A. 1991.

The antiquity of group I introns. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **1**:478-484.

Southern, E. M.

1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**:503-517.

Sprinzi, M., C. Steegborn, F. Hübel, und S. Steinberg.

1996. Compilation of tRNA sequences and sequences of tRNA genes. *Nucleic Acid Research* **24**(1):68-72.

Steffen P., S. Goyard und A. Ullmann.

1997. The *Bordetella pertussis* sigma subunit of RNA polymerase confers enhanced expression of *fha* in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **23**(5): 945-954.

Steinberg S., A. Misch und M. Sprinzi. 1993.

Compilation for tRNA sequences and sequences of tRNA genes. *Nucleic Acids Res.* **21**:3011-3015.

Stewart, T. S., R. J. Roberts und J. L. Strominger.

1971. Novel species of tRNA. *Nature* **230**:36-38.

Stommel, M..

1994. Untersuchungen zur Funktion einer tRNA^{Ile} und des im Gen inserierten Introns in *Azoarcus* sp. BH72. Diplomarbeit. Fachbereich Biologie, Philipps-Universität, Marburg.

Szweykowska-Kulinska Z., B. Senger, G. Keith, F. Fasiolo und H. Grosjean.

1994. Intron-dependent formation of pseudouridines in the anticodon of *Saccharomyces cerevisiae* minor tRNA^{Ile}. *EMBO J.* **13**(19):4636-4644.

Wada, K., Y. Wada, F. Ishibashi, T. Gojobori und T. Ikemura.

1992. Codon usage tabulated from the Genbank genetic sequence data. *Nucl. Acids Res.* **20**:2111-2118.

Weber, F., A. Dietrich, J.-H. Weil und L. Marechal-Drouard.

1990. A potato mitochondrial isoleucine tRNA is coded for a mitochondrial gene possessing a methionine anticodon. *Nucl. Acids Res. Vol.* **18**(17):5027-5030.

Williamson, R. M. und D. L. Oxender.

1992. Premature termination of *in vivo* transcription of a gene encoding a branched-chain amino acid transport protein in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174**:1777-1782.

Untersuchungen zur Funktion und Verbreitung

Xu, M.-Q., S. D. Kathe, H. Goodrich-Blair, S. A. Nierzwicki-Bauer und D. A. Shub.

1990. Bacterial origin of a chloroplast intron: Conserved self-splicing group I introns in Cyanobacteria. *Science* **250**:1566-1570.

Yanisch-Perron, C., J. Vieira und J. Messing.

1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**:103-119.

Zhou, J., M. R. Fries, J. C. Chee-Sanford und J. M. Tiedje.

1995. Phylogenetic analysis of a new group of denitrifiers capable of anaerobic growth on toluene and description of *Azoarcus tolulyticus* sp. nov.. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**:500-506.

Erklärung

Untersuchungen zur Funktion und Verbreitung

Ich versichere, daß ich meine Disssertation

"Untersuchungen zur Funktion und Verbreitung von selbstspießenden Introns der Gruppe I in Bacteria"

selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Michaela Stommel